

Diplomarbeit im Fach Biologie, Universität Bremen, Fachbereich 2

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung

**Temperaturanpassung mitochondrialer Enzyme des
Kabeljaus (*Gadus morhua*) im latitudinalen Gradienten**



vorgelegt von

Lars Gregor Eckerle

Bremen, 2001

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	8
2.1	Wachstumsexperimente	8
2.1.1	Probennahme	8
2.1.2	Auswahl der Proben.....	9
2.2	Analysen	9
2.2.1	Aktivität des Elektronen-Transport-Systems (ETS).....	9
2.2.1.1	Extraktion.....	10
2.2.1.2	Messung der ETS-Aktivität	10
2.2.2	Aktivität der Cytochrom c-Oxidase (COX).....	11
2.2.2.1	Extraktion.....	11
2.2.2.2	Messung der COX-Aktivität	11
2.3	Berechnungen.....	12
2.3.1	Enzymaktivitäten.....	12
2.3.2	Q ₁₀ -Werte und Arrhenius-Aktivierungsenergien.....	13
2.4	Statistik	14
3	Ergebnisse	16
3.1	Anpassung der ETS-Methode	16
3.1.1	Homogenisation	16
3.1.2	ETS-Assay	18
3.1.3	Einfluß der Lagerung auf die ETS-Aktivität.....	21
3.2	Überprüfung der ETS-Methode	23
3.2.1	Vergleich mit den Aktivitäten anderer oxidativer Enzyme	23
3.2.2	Korrelation der Aktivitäten des ETS, der COX und der CS	25
3.3	Aerobe Kapazität der Gewebe	27
3.3.1	Enzymaktivitäten im weißen Muskel	27
3.3.2	Enzymaktivitäten in der Leber	33
3.4	Temperaturabhängige Eigenschaften der Enzyme	37
3.4.1	Arrhenius-Analyse und Q ₁₀ -Werte für das ETS.....	37
3.4.2	Arrhenius-Analyse und Q ₁₀ -Werte für die COX	41
4	Diskussion	44
4.1	ETS-Methode	44
4.2	Einfluß der Temperatur auf die aerobe Kapazität	47
4.3	Einfluß weiterer ökologischer Faktoren	52
4.4	Eigenschaften mitochondrialer Enzyme	54
5	Zusammenfassung	57
6	Literatur	58
7	Anhang	65

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
COX	Cytochrom c-Oxidase
CS	Citrat-Synthase
E_a	Arrhenius-Aktivierungsenergie
ETS	Elektronen-Transport-System
FG	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung
INT	2-(p-Iodophenyl)-3-(p-Nitrophenyl)-5-Phenyl-Tetrazolium-chlorid
MO_2	Sauerstoffverbrauch
n	Anzahl der Versuchtiere
NADH	Nikotinamid-Adenosin-Dinukleotid
NADH-DH	NADH-Dehydrogenase
NC	Nordseekabeljau
NCC	Norwegischer Küstenkabeljau
NEAC	Nord-Ost-Arktischer Kabeljau
ox.	oxidiert
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Q_{10}	Beschleunigungsrate eines physiologischen Prozesses bei einer Temperaturerhöhung um 10°C
r	Korrelationskoeffizient
red.	reduziert
SDH	Succinat-Dehydrogenase
t	Zeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
UQ	Ubichinon
UQ-Ox.-Red.	Ubichinon-Oxidoreduktase
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

Die Temperatur hat einen entscheidenden Einfluß auf die Physiologie ektothermer Organismen, zu denen auch die meisten Meeresbewohner gehören. Eine Veränderung des Erdklimas aufgrund der viel diskutierten globalen Erwärmung ist daher ein nicht zu unterschätzender Faktor für die Verbreitung und Entwicklung mariner Populationen. Die Auswirkungen von klimatisch bedingten Temperaturveränderungen auf marine Küstenfische werden in dem EU-Projekt CLICOFI (Effects of climate induced temperature changes on marine coastal fishes) auf der Basis ökologischer, physiologischer und genetischer Befunde an zwei Modellspezies, der Aalmutter (*Zoarces viviparus*) und dem Kabeljau (*Gadus morhua*), untersucht.

Ektotherme Organismen, zu denen auch die Fische (*Teleostei*) zählen, sind im Allgemeinen nicht zu einer Regulation ihrer Körpertemperatur in größerem Ausmaß fähig, die Temperatur in den Zellen entspricht daher der des sie umgebenden Mediums. Da die Reaktionsgeschwindigkeiten biochemischer Prozesse temperaturabhängig sind, wirkt sich dies auf den gesamten Stoffwechsel aus. Ein Maß für diese Abhängigkeit ist der Q_{10} -Wert, der angibt um welchen Faktor die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung um 10°C zunimmt. Die empirisch ermittelten Werte für die meisten physiologische Prozesse liegen zwischen 2 und 3.

Abhängig von ihren Verbreitungsgebieten sind Tiere unterschiedlich großen Temperaturschwankungen ausgesetzt und können die damit verbundenen physiologischen Veränderungen mehr oder weniger gut tolerieren. Man unterscheidet zwischen stenothermen und eurythermen Arten, wobei die Übergänge zwischen beiden fließend sind. Stenotherme Organismen sind nur schlecht oder gar nicht in der Lage, Temperaturveränderungen zu tolerieren und können daher nur in Lebensräumen mit geringen Schwankungen der Umgebungstemperatur überleben. Zu diesen gehören z. B. die Polarmeere der Arktis und Antarktis, in denen Temperaturen von -1,9 bis maximal 2°C vorherrschen (Clarke, 1998). Eurytherme Tiere haben dagegen die Möglichkeit, sich an kurzfristige Temperaturveränderungen anzupassen und können auch Lebensräume mit größeren Temperaturschwankungen besiedeln. Solche Lebensräume finden sich unter anderem in der Nordsee, in der die Wassertemperaturen im oberflächennahen Bereich jahreszeitlich bedingt zwischen 0 und 20°C schwanken können (Sondergutachten Nordsee, 1980).

Die Anpassung an zeitlich begrenzte, meist saisonale Veränderungen der Umgebungsbedingungen wird als Akklimatisation bezeichnet, wobei verschiedene ökologische Faktoren

eine Rolle spielen. Wird unter Laborbedingungen nur ein spezifischer Faktor verändert, z. B. die Temperatur, spricht man von einer Akklimation. Dagegen versteht man unter Adaptation die genetische Anpassung an Veränderungen über einen langen Zeitraum, wie sie bei der Besiedelung neuer Lebensräume auftritt (Clarke, 1987).

Da das Leben vermutlich in wärmeren Gebieten entstand (Arntz et al., 1994), werden niedrige Temperaturen im allgemeinen als Extremsituation für Organismen betrachtet. Niedrige Umsatzraten des Stoffwechsels sind, aufgrund der Q_{10} -Regel, sind unter diesen Umständen die Folge. Dies hat auch Einfluß auf die an der Substratoxidation beteiligten Prozesse und führt zu einem verringerten Energieangebot. Da es für die Funktion von Enzymen erforderlich ist, auch bei veränderten Umweltbedingungen das intrazelluläre Milieu durch z. T. aktive Regulation innerhalb enger Grenzen konstant zu halten (Homöostase), nimmt der Grundenergiebedarf, der dem Ruhestoffwechsel entspricht, nicht im gleichen Maß ab wie das Energieangebot. Dies führt dazu, daß der Energiebetrag der in Aktivitäten, Fortpflanzung oder Wachstum investiert werden kann deutlich geringer ausfällt als bei höheren Umgebungstemperaturen (Clarke, 1998). Der Einschränkung des Energieangebots kann durch eine Verbesserung der Energieproduktion entgegengewirkt werden. Die Mechanismen, die bei der Akklimation eine Rolle spielen sind dabei recht gut untersucht. Eine Möglichkeit die Energieproduktion zu erhöhen, ist die Steigerung von Enzymaktivitäten, durch eine größere Anzahl von Enzymen, wie sie mit der Proliferation der Mitochondrien einhergehen kann (Egginton und Sidell, 1989; St-Pierre et al., 1998). Neben dieser quantitativen kann auch eine qualitative Anpassung der Enzyme erfolgen, z. B. durch Veränderungen der Enzymstruktur oder die stärkere Expression anderer Isoenzyme (Shaklee et al., 1977; Hoffman, 1983). Veränderungen, die durch diese beiden Anpassungsstrategien ausgelöst werden, können direkt durch Messung der Enzymaktivitäten erfasst werden. Eine dritte Möglichkeit die Aktivität von Enzymen zu erhöhen, die dabei nicht erfasst werden kann, ist die Anpassung der zellulären Umgebung. Dabei spielt die Temperaturabhängigkeit der Stabilität biologischer Membranen eine wichtige Rolle. Um deren Funktion zu garantieren muß die Lipidzusammensetzung, die unter anderem die Festigkeit der Membran bestimmt, an die Temperatur angepasst werden, was wiederum einen Einfluß auf die Aktivitäten membrangebundener Enzyme hat (Wodtke, 1976, 1981; Cossins, 1994).

Bei der Anpassung an dauerhafte Veränderungen der Umweltbedingungen kommen die gleichen Mechanismen zum Einsatz wie bei der Akklimation. Im Verlauf der Zeit können aber auch genetische Veränderungen, also eine Adaptation erfolgen.

Bei Messungen der Respirationsraten polarer Fische wurde zunächst ein höherer Sauerstoffverbrauch ermittelt, als aufgrund der Extrapolation der Raten borealer Tiere mit einem Q_{10} von 2,5 zu erwarten war (Scholander et al., 1953; Wohlschlag, 1960). Diese Beobachtungen eines erhöhten Grundstoffwechsels bei kalt-angepassten Arten ging unter dem Begriff *metabolic cold adaptation* (metabolische Kälteadaptation, MCA) in die Literatur ein. Die Theorie wurde jedoch durch die Ergebnisse späterer Respirationsmessungen in Frage gestellt, bei denen polare Fische ähnliche oder sogar niedrigere Grundstoffwechselraten zeigten, als für boreale Tiere extrapoliert wurden (Saunders, 1963; Holeton, 1973). Die erhöhten Werte früherer Arbeiten wurden dabei auf Stress der Versuchstiere durch mangelnde Erholungszeiten nach dem Einsetzen in die Respirationskammern zurückgeführt (Holeton, 1974). In weiteren Untersuchungen bei Fischen zeigte sich, daß auch die Ökologie der Tiere, insbesondere die Aktivität, und die Phylogenie den Ruhesauerstoffverbrauch mitbestimmen (Johnston et al., 1991; Clarke, 1993, 1999). Unter Beachtung dieser Faktoren konnte schließlich kein Beweis für einen erhöhten Grundstoffwechsel bei polaren Tiere gefunden werden (Clarke, 1999). Im Gegensatz dazu ließ sich aber bei antarktischen im Vergleich zu borealen Fischen eine Erhöhung der aeroben Kapazität beobachten, die die maximal mögliche Stoffwechselrate widerspiegelt. Dies zeigt sich in höheren Mitochondriendichten (Dunn, 1988; Johnston et al. 1998), die mit einer Zunahme der Aktivitäten oxidativer Enzyme um den Faktor 1,5 bis 5 einhergehen (Crocket und Sidell, 1990; Torres und Somero, 1988), wobei die spezifische respiratorische Kapazität der einzelnen Mitochondrien unverändert bleibt (Johnston et al., 1994; Guderley, 1998; Hardewig et al., 1999b).

Bei der Akklimatisation eurythermer Fische an niedrige Umgebungstemperaturen konnte ebenfalls eine Erhöhung der Mitochondriendichten beobachtet werden, meist untersucht im roten und weißen Muskel (Johnston, 1982; Eggington und Sidell, 1989). Im Gegensatz zur Adaptation zeigte sich jedoch auch eine Steigerung der oxidativen Kapazität der einzelnen Mitochondrien (Guderley und Johnston, 1996; St-Pierre et al., 1998). Dieser Effekt findet sich auch in den Aktivitäten mitochondrialer Enzyme wieder. Bei Untersuchungen der Cytochrom c-Oxidase im weißen Muskel konnte bei kalt-„akklimierten“ eurythermen Nordsee-Aalmuttern *Zoarces viviparus* signifikant höhere Aktivitäten festgestellt werden, als bei der nahe verwandten, kalt-adaptierten stenothermen antarktischen Aalmutter *Pachycara brachycephalum* (Hardewig et al., 1999a). Dies führte zu der Hypothese, daß die kurzfristige Akklimatisation eurythermer Fische an niedrige Temperaturen eine stärkere Erhöhung der aeroben Kapazität induziert, als die langfristige Adaptation bei stenothermen Tieren (Pörtner et al., 2000).

Diese Veränderung der Stoffwechselkapazität bei der Akklimation an unterschiedliche Temperaturbedingungen, in Abhängigkeit vom Grad der Eurythermie, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Aktivitäten der Enzyme der Atmungskette bestimmt, wobei die Methode zur Messung der Aktivität des Elektronen-Transport-Systems (ETS) mit Hilfe der Reduktion des Tetrazolium Salzes 2-(p-Iodophenyl)-3-(p-Nitrophenyl)-5-Phenyl-Tetrazolium-chlorid (INT) zu Formazan zur Anwendung kommen sollte (Packard und Healy, 1968). Diese wurde hauptsächlich entwickelt und angewendet um die Sauerstoffverbrauchsraten von Plankton und Sedimentproben abzuschätzen, fand aber im biochemisch physiologischen Bereich bisher kaum Anwendung. Daher musste sie für die Messung von Geweben mit vergleichsweise hohen Enzymaktivitäten zunächst modifiziert werden. Es war weiterhin zu prüfen, ob sie sich eignet, um Veränderung der aeroben Kapazitäten zu detektieren. In früheren Arbeiten konnte zwischen der ETS-Aktivität und dem Sauerstoffverbrauch *in vivo* eine lineare Korrelation beobachtet werden (Owens und King, 1975; Packard, 1985; Cammen et al., 1990). Daher wurde außerdem getestet, ob die Methode auch quantitativ einsetzbar ist.

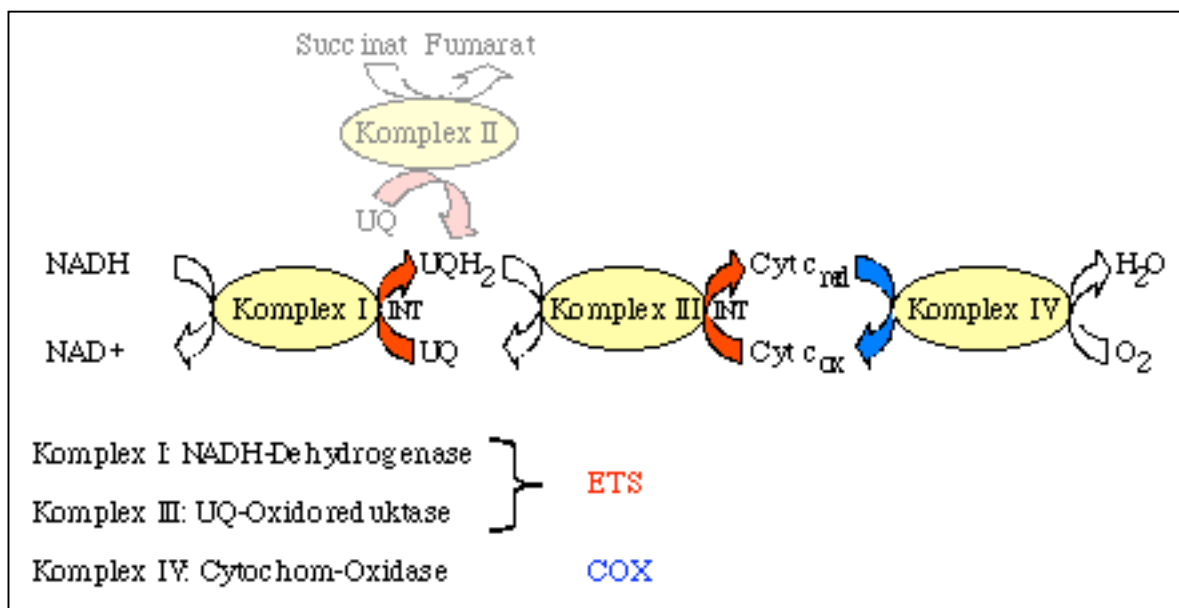


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette und der gemessenen enzymatischen Reaktionen. Erklärung im Text.

Mit der ETS-Methode können, abhängig vom zugegeben Substrat, verschiedene Komplexe der Atmungskette erfaßt werden (Abb. 1.1, rot markiert). Mit NADH als Substrat sind dies zum einen die NADH-Dehydrogenase (Komplex I), die die eingehende Übertragung von zwei Elektronen auf Ubichinon (UQ) katalysiert, und zum anderen die UQ-Oxidoreduktase (Komplex III), welche die Elektronen auf den Ein-Elektronenakzeptor Cytochrom c (Cyt c) überträgt (Packard, 1985). Mit Succinat kann außerdem der Komplex II

(Succinat-Dehydrogenase) erfaßt werden. Da durch Succinat das NADH-gesättigte System inhibiert werden kann (Owens und King, 1975), wurde auf die Zugabe verzichtet. Des weiteren ist mit NADPH als Substrat auch die Messung der Aktivität des Elektronen-Transport-Systems der Mikrosomen möglich, die war für die Fragestellung aber nicht von Interesse (nicht dargestellt).

Als Vergleichspunkt wurde zudem die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase (COX) gemessen, die den terminalen Schritt der Atmungskette, die Reduktion von Sauerstoff (O_2) katalysiert (Abb. 1.1, blau markiert). Die COX überträgt die Elektronen vom Ein-Elektronen-donor Cytochrom c (Cyt c) zum Vier-Elektronenakzeptor O_2 , ohne daß dabei unvollständig reduzierte, reaktive Zwischenstufen entstehen (Brunori und Wilson, 1982).

Zum weiteren Vergleich kann außerdem die Aktivität der Citrat-Synthase dienen, die an den untersuchten Proben in früheren Arbeiten gemessen wurde (Serendero-Krause, 2000, A. Schmidt, pers. Mitteilung).

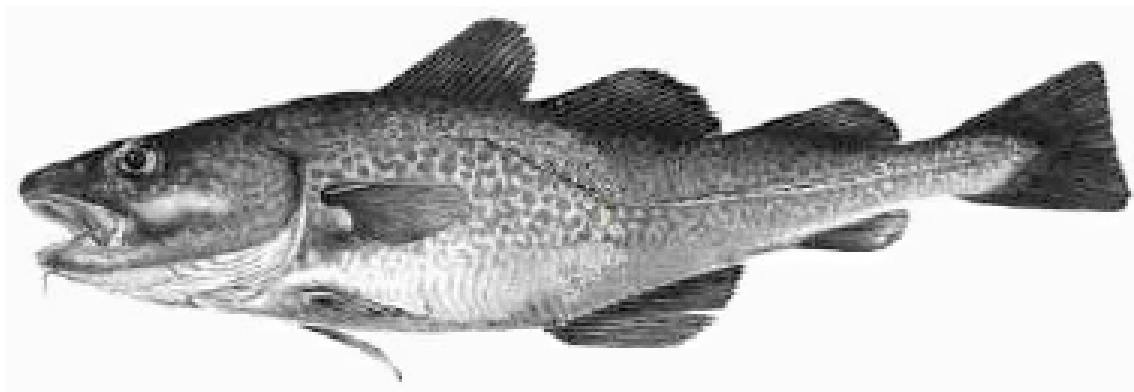


Abb. 1.2: *Gadus morhua*

Die Untersuchung erfolgte am Kabeljau *Gadus morhua* (Abb. 1.2). Dieser gehört zur Familie der *Gadidae* (Dorschartige), die zusammen mit der Familie der *Zoarcidae* die Ordnung *Gadiformes* bilden. Er hält sich im allgemeinen in küstennahen Schelfgebieten auf und ist in Tiefen von 5 – 600 m meistens grundnah, aber auch im Pelagial zu finden. Die Tiere bevorzugen Wassertemperaturen zwischen 2 und 10°C und können ein Alter von bis zu 25 Jahren und Größen von über 100 cm erreichen. Die Geschlechtsreife erlangen sie in den südlicheren Verbreitungsgebieten zwischen 2 und 6 Jahren, in den polaren Regionen dagegen erst zwischen 6 und 15 Jahren. Die meisten Populationen laichen im Frühjahr ab. Der Kabeljau ist als beliebter Speisefisch von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung für die Fischerei, die Auswirkungen von Temperaturveränderungen auf seine Physiologie ist daher nicht nur aus biologischer Sicht von Interesse (Muus, 1991).

Das Verbreitungsgebiet von *G. morhua* erstreckt sich von der nördlichen Biskaya bis in arktische Regionen (Abb. 1.3). Es lassen sich einzelne Populationen unterscheiden, die aufgrund unterschiedlicher Laichgebiete genetisch voneinander getrennt sind. Der Kabeljau bietet sich daher zur Untersuchung der Fragestellung an (siehe unten). Diese erfolgte an drei Populationen aus dem latitudinalen Gradienten. Der Nord-Ost-Arktische Kabeljau (North-Eastern-Arctic Cod = NEAC) findet in seinem Lebensraum homogen niedrige Temperaturen zwischen 0 und 2°C vor, und könnte daher Eigenschaften stenothermer Tiere aufweisen. Gleiches gilt für den Norwegischen Küstenkabeljau (Norwegian Coastal Cod = NCC) aus einem Gebiet auf der Höhe von Bergen, der Temperaturen zwischen 2,5 und 4,5°C begegnet (nach Dippner, 1999). Dagegen ist der Nordseekabeljau (North Sea Cod = NC) aus der Deutschen Bucht wesentlich größeren jahreszeitlichen Temperaturschwankungen ausgesetzt. Er toleriert Umgebungstemperaturen bis 10°C und besitzt vermutlich Charakteristika eurythermer Tiere. Bei Temperaturen oberhalb von 10°C wandert die Population in kältere Gewässer vor die Norwegische Küste ab (T. Fischer, pers. Mitteilung).

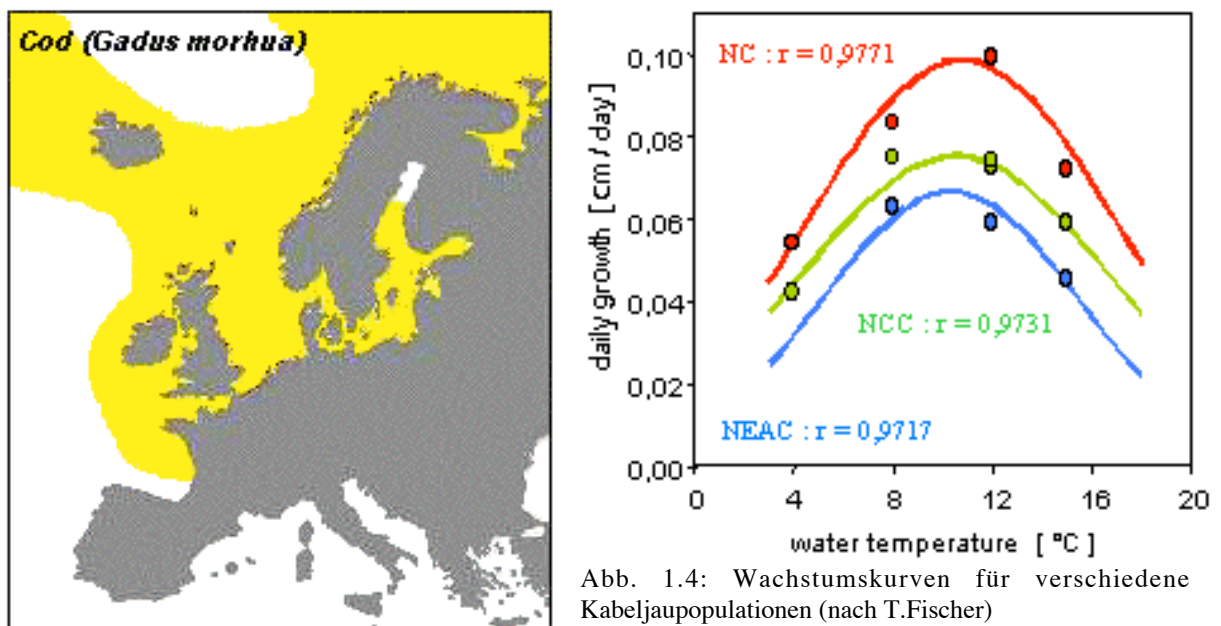


Abb. 1.3: Verbreitungsgebiet von *Gadus morhua* (CLICOFI)

Wie bei Untersuchungen der temperaturabhängigen Wachstumsrate nachgewiesen werden konnte, bestehen deutliche Unterschiede zwischen den drei Populationen (Abb. 1.4). Zwar lag bei allen die optimale Temperatur für das Wachstum zwischen 10 und 11°C, im latitudinalen Gradienten zeigte sich jedoch eine Zunahme der Wachstumsraten in Richtung der südlichen Verbreitung (Pörtner et al., 2001). Die Gewebeprobe, an denen die aeroben Kapazitäten bestimmt wurden, stammen von den Tieren aus diesen Wachstumsexperimenten.

Die Veränderungen der aeroben Kapazität bei der Akklimation ist in verschiedenen Geweben unterschiedlich (Cai und Adelman, 1990; Foster et al., 1993). Daher wurde neben dem eher anaeroben Gewebe des weißen Muskels auch die Leber, ein Gewebe mit höherer oxidativer Kapazität, untersucht.

Folgende Fragen sollten in der vorliegenden Arbeit behandelt werden:

1. Welchen Einfluß hat Akklimation an verschiedene Temperaturen auf die Aktivität mitochondrialer Enzyme von Kabeljaupopulationen, die abhängig von ihrem Lebensraum nominell stenotherm oder eurytherm sind?
2. Gibt es Unterschiede in der Temperaturanpassung beim eher anaeroben weißen Muskel und dem aeroben Gewebe der Leber?
3. Können für die Atmungskettenenzyme beim Kabeljau Anpassungen an die Temperatur auf dem Niveau der Enzymeigenschaften festgestellt werden?
4. Lassen sich mit der Messung der Aktivität des Elektronen-Transport-Systems qualitative Veränderungen der aeroben Kapazität an tiefgefrorenen Geweben bestimmen und ist sie auch quantitativ einsetzbar?

2 Material und Methoden

2.1 Wachstumsexperimente

Die Versuchstiere wurden für Untersuchungen des Temperatureinflusses auf die Wachstumsrate bei insgesamt drei bis vier verschiedenen Temperaturen über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten gehältert.

Bei einem ersten Experiment an der Universität Bergen (Norwegen) setzte man unter Laborbedingungen aufgezogene Nachkommen der Nord-Ost-Arktischen und der Norwegischen Population ein. Im Alter von etwa einem Jahr wurden die Tiere zur individuellen Identifizierung markiert und von Ende Mai 1998 bis Anfang März 1999 bei 8, 12 oder 15°C gehältert. Die Fütterung erfolgte im Überschuß mit handelsüblichem Trockenfutter. Zur Ermittlung der Wachstumsraten wurden alle sechs Wochen Länge und Gewicht der Tiere bestimmt.

Von Januar 1999 bis März 2000 fand ein ergänzender Versuch in Bergen statt, bei dem Norwegischer Küstenkabeljau unter ansonsten gleichen Bedingungen bei 4°C und zur Kontrolle erneut bei 12°C inkubiert wurde. Auf die Arktische Population musste bei diesem Experiment verzichtet werden, da keine Tiere verfügbar waren.

An der Biologischen Anstalt Helgoland folgte ein weiteres Wachstumsexperiment mit Nordseekabeljau. Im Unterschied zu den norwegischen Untersuchungen handelte es sich hier um Wildtiere, die man im Frühjahr 1999 mit dem Netz und später mit der Angel in der Deutschen Bucht gefangen hatte. Nach der Markierung wurden die Dorsche in Tanks mit 4, 8, 12 oder 15°C temperiertem Wasser überführt. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit kleingeschnittenen Sprotten. Nach einer Eingewöhnungszeit von etwa vier Wochen wurden von Anfang Juni bis Anfang September, wöchentlich Länge und Gewicht der Tiere bestimmt.

2.1.1 Probennahme

Nach Beendigung der Wachstumsexperimente wurden die Fische anästhetisiert und Länge und Gesamtgewicht gemessen. Anschließend wurden sie getötet und es fand eine rasche Präparation auf Eis statt, bei der unter anderem die Leber und ein Stück weißen Muskels entnommen und mit einer gekühlten Wollenbergerzange in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden (Wollenberger et al. 1960). Im Verlauf der Präparation erfolgte die Bestimmung des Geschlechts, des Gonadosomatischen Indexes (GSI) und des Hepatosomatischen Indexes (HSI) für weiterführende Untersuchungen.

Die Gewebeproben lagerten zunächst bei -70 bis -80°C und während des Transports nach Bremerhaven zum Alfred-Wegener-Institut kurzfristig bei -20°C . Dort wurden sie in eine Gefriertruhe mit einer Temperatur von -130°C überführt.

2.1.2 Auswahl der Proben

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden Gewebe von weiblichen Tieren mittlerer Größe ohne erkennbare Krankheiten oder Verletzungen verwendet. Bei den vorhandenen Geweben fiel die Wahl zunächst auf den weißen Muskel, da dieser den größten Teil des Tieres ausmacht. Es handelt sich hier um ein Gewebe mit hohem anaeroben Potential, daher wurden vergleichende Messungen an der Leber, einem Gewebe mit hoher aerober Kapazität, durchgeführt.

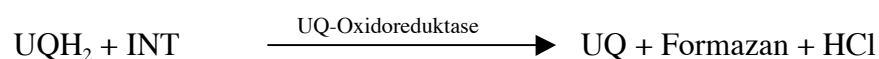
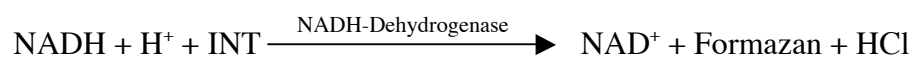
2.2 Analysen

Sämtliche Analysen erfolgten über enzymatisch-optische Tests an einem mit Hilfe eines Thermostaten (Julabo, F 30) extern gekühlten Spektrophotometer (Beckmann, DU 7400). Die verwendeten Chemikalien wurden von Roche Diagnostics oder Fluka in hoher Reinheit bezogen.

2.2.1 Aktivität des Elektronen-Transport-Systems (ETS)

Die Messung des Elektronen-Transport-Systems beruht auf der Reduktion von 2-(p-Iodophenyl)-3-(p-Nitrophenyl)-5-Phenyl-Tetrazolium-chlorid (INT) zu Formazan und Salzsäure (HCl). Formazan besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 490 nm, mit einem Extinktionskoeffizienten ϵ_{490} von $15,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Kenner und Ahmed, 1975) und kann photometrisch erfaßt werden.

Die vollständige Reduktion benötigt zwei Elektronen (Packard, 1971 und 1985). Daraus ergeben sich folgende Summenformeln für die Reaktionen:



2.2.1.1 Extraktion

Die Extraktion für die Bestimmung des ETS erfolgte modifiziert nach der Methoden für Cytochrom c-Oxidase (Hardewig et al., 1999a). Ein Stück des gefrorenen Gewebes wurde im Mörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. In ein 10 ml PU-Röhrchen wurden 4 ml Homogenisationspuffer (0,1 M Phosphatpuffer, 75 μ M MgSO_4 , 1,5 mg/ml Polyvinylpyrrolidon, 0,2% (v/v) Triton X-100, pH 8,5, nach Owens und King, 1975) vorgelegt. 20 bis 40 mg gefrorenes Gewebepulver wurden in das Gefäß eingewogen und mit Homogenisationspuffer auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt. Anschließend erfolgte der Aufschluß der Zellen mit dem Ultra-Turrax (IKA, Ultra-Turrax T8) für 3 x 10 s bei maximaler Leistung, gekühlt durch ein Eisbad. Das Homogenat wurde in einer auf 0°C temperierten Zentrifuge (Heraeus Christ, Minifuge GL) 10 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand mittels einer Kunststoff-Pasteurpipette abgenommen. Da die Leber einen relativ hohen Fettanteil besitzt, durch den die Messung beeinflusst würde, mußte dieser zunächst abgetrennt werden. Dazu wurden 2 ml des Homogenats vor der Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5402) in ein Eppendorfcup überführt. Anschließend wurde die Wand des Gefäßes mit einer 1 ml Einwegspritze knapp oberhalb des Pellets perforiert und der Überstand unterhalb der Fettschicht abgenommen.

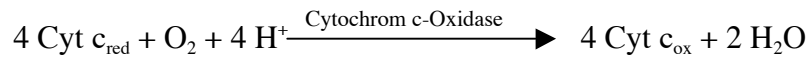
Die Extrakte wurden umgehend der Messung zugeführt, da das Enzym einen starken Aktivitätsverlust über die Zeit zeigte (Abb. 3.5). Für die Bestimmung der Temperaturkinetik musste für jede Temperatur ein neuer Extrakt hergestellt werden. Um trotzdem möglichst homogene und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde zu Beginn ein größeres Gewebestück gemörsert und das Pulver in modifizierten PU-Röhrchen bis zur Messung (maximal 3 Tage) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.1.2 Messung der ETS-Aktivität

Die Bestimmung der ETS-Aktivität erfolgte modifiziert nach Owens und King (1975). 600 bis 680 μ l Assaypuffer (0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,5) und 300 μ l INT-Lösung (2,0 mM im Test) wurden in einer Küvette vorgelegt und im Photometer temperiert. Nach Zugabe von 200 μ l Substratlösung (0,85 mM NADH im Test) wurde mit der Messung begonnen. Die Ermittlung eines Blindwertes für die nicht-enzymatisch katalysierte Reduktion von INT erfolgte über die Aufnahme eines Vorlaufes von 5 min. Daraufhin wurde die Reaktion mit 20 bis 100 μ l Extrakt gestartet. Die ETS-Aktivität ermittelt sich über den Anstieg der Extinktion in den ersten 5 min nach der Probenzugabe.

2.2.2 Aktivität der Cytochrom c-Oxidase (COX)

Die Messung der Cytochrom c-Oxidase erfolgte anhand der Abnahme des reduzierten Cytochrom c. Dieses besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einem Extinktionskoeffizienten ϵ_{550} von $19,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Gleichung der katalysierten Reaktion lautet wie folgt:



2.2.2.1 Extraktion

Die Extraktion erfolgte gemäß Hardewig, et al. (1999a). Ein Stück tiefgefrorenen Gewebes wurde unter flüssigem Stickstoff im Mörser pulverisiert. In ein 2 ml Eppendorfcup wurde 1 ml eisgekühlter Homogenisationspuffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1% (v/v) Tween[®] 20, pH 7,4) vorgelegt und auf der Analysenwaage tariert. Etwa 150 mg des Gewebepulvers wurden eingewogen und durch Zugabe von Homogenisationspuffer auf ein Verhältnis Puffer : Gewebe von 9 : 1 gebracht. Anschließend wurde die Suspension mit einem Ultra-Turrax (IKA, Ultra-Turrax T8) für 3 x 10 s bei maximaler Leistung, gekühlt durch ein Eisbad, aufgeschlossen. Beim weißen Muskel erfolgte die Messung mit diesem ungereinigten Homogenat. Die Leberhomogenate wurden in einer gekühlten Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5402) 10 min bei 1000 g zentrifugiert (Pelletier et al., 1994). Die Probe wurde wie bei der ETS-Extraktion entnommen und bis zur Messung auf Eis gestellt. Die COX-Aktivität im Extrakt blieb über mehrere Stunden stabil.

2.2.2.2 Messung der COX-Aktivität

Die Messung erfolgte nach Moyes et al. (1997). 850 bis 930 μl Assaypuffer (20 mM Tris-HCl, 0,5% (v/v) Tween[®] 20, pH 8,0) wurde in die Küvette vorgelegt und temperiert. Nach Zugabe von 50 μl Substratlösung (0,05 mM Cyt c_{red} im Test) wurde ein Vorlauf von 2 min als Blindwert aufgenommen. Die Messung der COX-Aktivität erfolgte über die Abnahme der Extinktion in den ersten 1,5 min nach dem Start der Reaktion durch 20 bis 100 μl Probe.

Da Cytochrom c handelsüblich oxidiert vorliegt, mußte es zunächst reduziert werden. Dies erfolgte modifiziert nach Rafael (1983) durch Zugabe von Natriumdithionit und anschließende Reinigung mittels Gelfiltration in einer Sephadex G-25 Säule. Alle Arbeitsschritte wurden mit N_2 -begastem, sauerstofffreiem 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 durchgeführt. Die gebrauchsfertige Substratlösung wurde in gasdichte 2 ml Serumfläschchen

überführt, nochmals mit Stickstoff begast und konnte bei -20°C über längere Zeit ohne Beeinträchtigung aufbewahrt werden (Cai und Adelman, 1990).

2.3 Berechnungen

2.3.1 Enzymaktivitäten

Aus der Extraktionsmethode für die angewendeten enzymatischen Tests ergibt sich ein Verdünnungsfaktor (VF) [ml/g] der bei der Berechnung der Aktivitäten zu berücksichtigen ist. Er berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{VF} = \frac{0,8 \text{ Einwaage (g)} + \text{Volumen Homogenisationspuffer (ml)}}{\text{Einwaage (g)}} \quad (6)$$

Der Faktor 0,8 steht dabei für den durchschnittlichen Wasseranteil im Gewebe.

Als weiterer Faktor muß in die Berechnungen die Verdünnung in der Küvette (f) einbezogen werden:

$$f = \frac{\text{Assayvolumen } (\mu\text{l})}{\text{Probenvolumen } (\mu\text{l})} \quad (7)$$

Die Enzymaktivität ermittelt sich aus der Veränderung der Extinktion (ΔE) über die Zeit (t) (min^{-1}). Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde sie in die Veränderung der Substratkonzentration (Δc) pro Zeit [mM min^{-1}] umgerechnet:

$$\Delta c / \Delta t = \frac{\Delta E}{\Delta [\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}] d (\text{cm}) \Delta t (\text{min})} \quad (8)$$

Die Schichtdicke d beträgt für die verwendeten Halbmikroküvetten 1 cm.

Multipliziert man mit den oben eingeführten Verdünnungsfaktoren, erhält man die Enzymaktivität (k) in [$\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{FG}$]:

$$k = \frac{\Delta E \text{ VF [ml/g]} f}{\Delta [\text{mM}^{-1}] \Delta t (\text{min})} \quad (9)$$

Um die Ergebnisse von ETS und COX besser miteinander vergleichen zu können, wurde die Enzymaktivität jeweils in den äquivalenten Sauerstoffverbrauch pro Zeit [$\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$] umgerechnet.

Dadurch ergibt sich für die ETS-Aktivität (ETS_A) mit einem Verhältnis $\text{O}_2 : \text{INT}$ von 1 : 2 und einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{490} = 15,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ die Gleichung:

$$\text{ETS}_A = 0,5 \frac{\Delta E \cdot V \cdot f}{15,9 \Delta t} \quad [\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}] \quad (10)$$

Entsprechend ergibt sich für die COX-Aktivität (COX_A) mit dem Verhältnis $\text{O}_2 : \text{Cyt c} = 1 : 4$ und $\epsilon_{550} = 19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ die Gleichung:

$$\text{COXA} = 0,25 \frac{\Delta E \cdot V \cdot f}{19,1 \Delta t} \quad [\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}] \quad (11)$$

1.1.2 Q_{10} -Werte und Arrhenius-Aktivierungsenergie

Der Q_{10} -Wert ist ein Maß für die Temperaturabhängigkeit einer chemischen Reaktion und gibt an, um welchen Faktor die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung um 10°C zunimmt. Er läßt sich durch die Auftragung ln-transformierten Enzymaktivitäten gegen die Meßtemperatur (T) ($^\circ\text{C}$) anhand der Steigung der Regressionsgeraden ermitteln:

$$Q_{10} = e^{10 (\Delta \ln(k) / \Delta T)} \quad (12)$$

Ein weiterer Parameter für die Charakterisierung einer enzymatisch katalysierten Reaktion ist die Arrhenius-Aktivierungsenergie (E_a) (kJ mol^{-1}). Sie gibt an, welcher Energiebetrag notwendig ist, um eine Reaktion zu starten. Zur Ermittlung der E_a trägt man die ln-transformierten Enzymaktivitäten gegen die inverse absolute Temperatur (T^{-1}) (K^{-1}) auf. Diese Form der Darstellung wird als Arrheniusplot bezeichnet. Aus der Steigung der Regressionsgeraden des Graphen wird dann, modifiziert nach Segel (1976), die Aktivierungsenergie berechnet, wobei R die allgemeine Gaskonstante ($8,31441 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) darstellt.

$$E_a = -R \frac{\Delta \ln(k)}{\Delta T^{-1}} \quad (13)$$

Anhand der Arrhenius-Darstellung können neben dem Betrag der Aktivierungsenergie auch Diskontinuitäten in der Steigung festgestellt werden, die eine Veränderung der E_a anzeigen. Die Temperatur, bei der ein solcher Bruch stattfindet, bezeichnet die Arrhenius-Break-Temperatur (ABT). Sie wird mittels einer Zwei-Phasen-Regression bestimmt (Nickerson et al., 1989). Dazu werden die Datensätze in zwei Segmente unterteilt. Beginnend an einem Ende der Temperaturskala werden die Meßwerte mit ihren x-Werten zu einer zweiten Datengruppe verschoben, und für beide Segmente jeweils eine Regressionsgerade berechnet. Nachdem die möglichen Unterteilungen analysiert wurden, wird das Geradenpaar mit der geringsten Summe der quadratischen Abweichungen bestimmt und auf einen signifikanten Unterschied in den Steigungen untersucht. Im Gegensatz zu den Beispielen von Nickerson et al. (1989) handelte es sich bei den festgesetzten x-Werten nicht um kontinuierliche Daten, sondern es wurden zu jeder Meßtemperatur mehrere Enzymaktivitäten aufgenommen. Die einzelnen Temperaturgruppen wurden daher als je ein x-Wert definiert und somit nur im Ganzen verschoben.

1.4 Statistik

Zuerst erfolgte eine Überprüfung der Datensätze auf Normalverteilung (Kolmogorov-Sirmnov-Anpassungstest) und homogene Varianzen (Bartlett-Test). Anschließend wurden die Ergebnisse mit dem Ausreißertest nach Nalimov (Noack, 1980) auf Abweichungen vom Mittelwert untersucht.

Mit einer Varianzanalyse (F-Test, Super ANOVA, Abacus Concepts) oder einer Covarianzanalyse (ANCOVA, Super ANOVA) wurde untersucht, ob signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten bestehen. Waren diese vorhanden, wurde mit dem Scheffé-Test (Post-Hoc, Super ANOVA) oder einer Kontrastanalyse (Contrasts, Super ANOVA) geprüft, welche Mittelwerte signifikant verschieden sind.

Die Zwei-Phasen-Regression zur Auswertung der Arrheniusplots erfolgte mit Hilfe einer Regressionsanalyse (Simple Regression, Super ANOVA) mit anschließendem t-Test für gepaarte Stichproben zur Prüfung, ob sich die Steigungen vor und nach der ABT signifikant unterscheiden.

Die im folgenden Ergebnisteil gemachten Angaben zu den ermittelten Werten beziehen sich, soweit nicht anders erwähnt, auf den Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD). Bei einer Stichprobenzahl $n = 2$ ist statt der SD die Mittlere Abweichung (MA) angegeben.

Bei den angegebenen Regressionsgleichungen, die über Regressionsanalysen (Simple Regression, Super ANOVA; Sigma Plot, SPSS) ermittelt wurden, ist der Korrelations-

koeffizient r nach Brevais und Pearson (Engel, 1997) als Maß für die Beziehung zwischen zwei normalverteilten Variablen, und die Irrtumswahrscheinlichkeit p für die Steigung der Geraden angegeben.

Ergebnisse, die mit einer Sicherheit von 95% ($p \leq 0,05$) unterschiedlich waren, wurden als signifikant verschieden betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Anpassung der ETS-Methode

Ausgehend von den Arbeiten von Owens und King (1975) und Madon et al. (1998) wurde die Methode zur Messung des Elektronen-Transport-Systems für die vorliegenden Kabeljau-proben optimiert. Die Vorversuche erfolgten bei einer Meßtemperatur von 16°C an tiefge-frorenem weißen Muskel von Nordseekabeljau, der für mitochondriale Untersuchungen bei 12°C gehältert wurde.

1.1.1 Homogenisation

Bei der Entwicklung einer geeigneten Homogenisationsmethode wurden drei Faktoren berücksichtigt, die einen großen Einfluß auf die Enzymausbeute erwarten ließen. Dies waren 1.) der Aufschluß der Zellen, 2.) die Reinigung des Homogenats von Zellbestandteilen, sowie 3.) das Verhältnis von Gewebe zu Puffer im Homogenat.

Aufschluß des Gewebes

Für die Wahl eines geeigneten Aufschlußverfahrens wurden zwei Methoden getestet, zum einen die Homogenisation mit dem Ultra-Turrax (3 x 10 s, Stufe 6) (Schalk, 1988) und zum anderen die Behandlung mit Ultraschall (2 min, 180 Watt, Output 50%, Branson sonifier 450) (Smith und Chong, 1982).

Tab. 3.1: Einfluß der Aufschlußmethode auf die gemessene ETS-Aktivität. (MW \pm SD, *signifikanter Unter-schied zur Behandlung nur mit Ultra-Turrax, ungepaarter t-Test, n = 4-8)

aufschlussmethode		ETS-Aktivität
Ultra-Turrax	Ultraschall	$[\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{FG}]$
+	+	$0,546 \pm 0,024$ *
+	-	$0,610 \pm 0,050$
-	+	$0,471 \pm 0,063$ *

Die ETS-Aktivität des Extraktes nach dem Aufschluß mit dem Ultra-Turrax lag sowohl signifikant über der nach der Behandlung nur mit dem Ultraschall, als auch über der nach einer Anwendung beider Methoden. Folglich wurden die Proben für die ETS-Messung aus-schließlich mit dem Ultra-Turrax behandelt.

Reinigung des Homogenats

Als nächstes wurde der Aktivitätsverlust durch die Reinigung des Homogenats minimiert. Eine Filtration wie von Madon et al. (1998) und Elderkin et al. (1998) beschrieben war auf Grund der Dichte des Homogenats nicht möglich. Für eine Reinigung durch Zentrifugation variieren die Angaben in der vorliegenden Literatur sehr stark. Daher wurde eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und Zeiten bei einer Temperatur von 0°C (Eppendorf Centrifuge 5402) durchgeführt.

Tab. 3.2: Einfluß der Zentrifugationsgeschwindigkeit und –dauer auf die ETS-Aktivität. (MW \pm MA, *signifikanter Unterschied zu 10 min bei 300 g, ANOVA, Post-Hoc, n=2)

Geschwindigkeit (g)	Dauer (min)	ETS-Aktivität [$\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]
0	10	0,434 \pm 0,000 *
300	10	0,611 \pm 0,011
1 000	10	0,346 \pm 0,097*
16 000	2	0,580 \pm 0,042
16 000	3	0,332 \pm 0,005 *

Die höchste ETS-Aktivität wurde bei einer Zentrifugation von 10 min bei 300 g gemessen. Bei höheren Zentrifugationsgeschwindigkeiten zeigten sich, mit Ausnahme der Zentrifugation für 2 min bei 16000 g, signifikant niedrigere Aktivitätswerte. Dies läßt vermuten, daß hier bereits ein Teil der recht großen Enzymkomplexe (NADH-DH: ca. 850 kDa, UQ-Ox.-Red.: 250 kDa; Lehninger, 1994) zusammen mit den Zellfragmenten in das Pellet gelangten. Wenn an Stelle der Zentrifugation das Homogenat für 10 min auf Eis gestellt wurde, damit die groben Zelltrümmer absedimentieren konnten, so zeigte sich eine signifikant geringere ETS-Aktivität als bei der Zentrifugation bei 300 g. Möglicherweise sind bei dieser Behandlung noch viele Zellbestandteile in der Lösung zurückgeblieben, die durch Wechselwirkungen mit den Enzymen, oder durch die stärkere Trübung der Probe zu einer Beeinträchtigung der Messung führten. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde für die Reinigung des Homogenats eine Zentrifugation mit einer Geschwindigkeit von 300 g und einer Dauer von 10 min gewählt.

Einwaage

Um die ideale Gewebekonzentration im Homogenat zu ermitteln, wurde eine Meßreihe mit verschiedenen Konzentrationen (2 bis 110 mg FG/ml) aufgenommen. Dabei erfolgte bei Einwaagen unter 50 mg FG/ml eine Erhöhung des Homogenatvolumens um die Ungenauigkeiten beim Einwiegen kleiner Massen zu verringern.

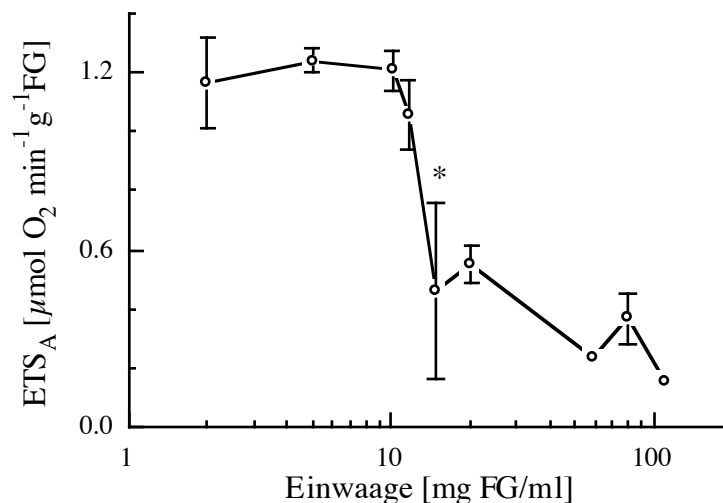


Abb. 3.1: Halblogarithmische Darstellung der Abhängigkeit der ETS-Aktivität von der Einwaage des Gewebes im Homogenat. (MW \pm SD, für Einwaagen > 58,6 mg FG/ml: MW \pm MA, *erstmaliger Unterschied zum vorhergehenden Wert, ANOVA, Post-Hoc, n = 2-7)

Es zeigte sich eine deutlich höhere ETS-Aktivität im Bereich der Einwaagekonzentrationen von 2 bis 11,6 mg FG/ml. Die Werte unterschieden sich hier nicht signifikant. Bei 14,8 mg FG/ml war eine signifikante Abnahme der ETS-Aktivität im Vergleich zum Ergebnis der vorherigen Konzentration von 11,6 mg FG/ml zu verzeichnen. Für die Messungen wurde daher eine Konzentration von 5 mg FG/ml im Homogenat gewählt. Diese liegt mit großer Sicherheit im Bereich der hohen Enzymaktivitäten.

1.1.2 ETS-Assay

Zur Messung der maximalen Kapazität eines Enzyms muß gewährleistet sein, daß das System substratgesättigt ist. Daher wurden für INT und NADH Sättigungskurven aufgenommen.

INT-Konzentration

Der Ansatz der INT-Stammlösung erfolgte zunächst nach Owens und King (1975) (4,0 mM INT in Wasser) und wurde im Verlauf der Vorversuche modifiziert (8,0 mM INT in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,5).

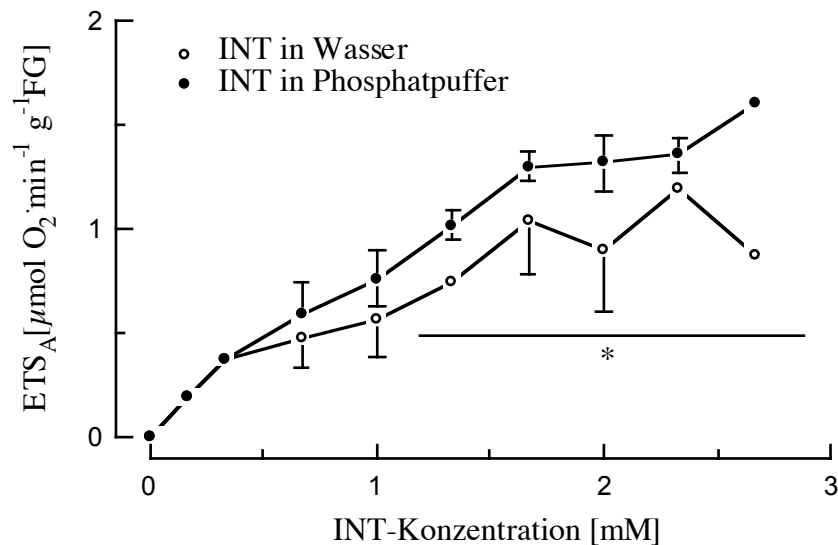


Abb. 3.2: Sättigungskurve für die INT-Konzentration im Assay für eine INT-Stammlösung in Wasser und 0,1 M Phosphatpuffer. (MW \pm SD für INT in Phosphatpuffer, n = 3; MW \pm MA für INT in Wasser, n = 2; keine MA oder SD für INT-Konzentration = 2,7 mM, n = 1; *signifikant unterschiedlicher Bereich zwischen den Ansätzen, ANOVA, Contrasts)

Bei beiden Ansätzen zeigte sich keine echte Substratsättigung. Dies bestätigt die Untersuchungen von Owens und King (1975), die jedoch nur bis zu einer Konzentration von 1,2 mM INT im Assay gemessen hatten. Die Kontrastanalyse ergab für die niedrigen INT-Konzentrationen bis 1,0 mM keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen ($p = 0,3035$). Ab einer Konzentration von 1,3 mM verlief der Graph für die INT-Stammlösung in Phosphatpuffer aber signifikant über dem Ansatz in Wasser ($p = 0,0001$). Die Veränderung der Ionenkonzentration im Assay durch die Verdünnung mit Wasser hatte also offensichtlich einen negativen Einfluß auf die ETS-Aktivität. Die Messungen wurden daher mit einer INT-Stammlösung in 0,1 M Phosphatpuffer durchgeführt. Obwohl sich keine deutliche Substratsättigung fand wurde die INT-Konzentration für die Messungen auf 2,0 mM INT festgelegt. Diese Konzentration befand sich in der Mitte eines Bereichs (1,7 bis 2,3 mM), in dem relativ konstante Aktivitätswerte gemessen wurden.

NADH-Konzentration

Der Ansatz der Substratlösung für die Aufnahme der Sättigungskurve erfolgte nach Madon et al. 1998 (5,1 mM NADH in 0,1 M Phosphatpuffer, 0,2% (v/v) Triton X-100, pH 8,5).

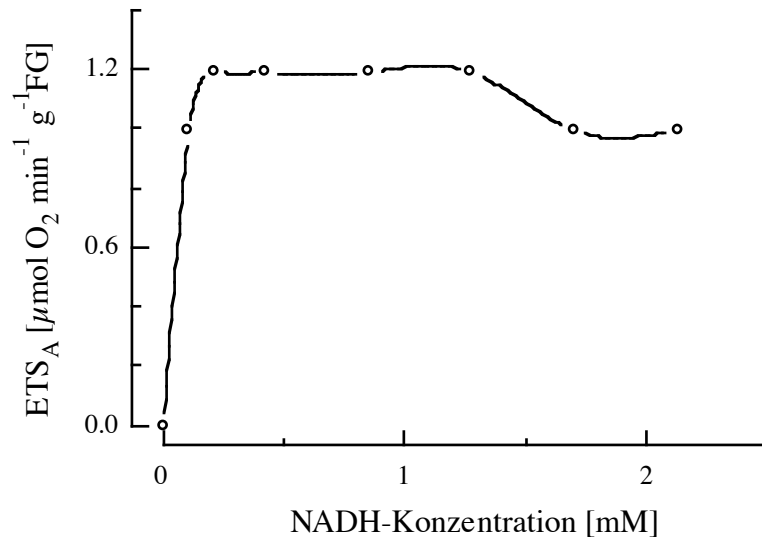


Abb. 3.3: Sättigungskurve für die NADH-Konzentration im Assay. (n = 1)

Wie bereits von Owens und King (1975) ermittelt zeichnete sich bei NADH früh eine Substratsättigung ab. Im Konzentrationsbereich von 0,21 bis 1,28 mM NADH im Assay fand sich ein Sättigungsplateau mit identischen ETS-Aktivitäten. Bei höheren Konzentrationen zeigten sich leicht verminderte Aktivitäten, was von anderen Autoren (Owens und King, 1975, G.-Toth et al., 1995) nicht festgestellt wurde. Es könnte sich hierbei um Meßungenauigkeiten oder einen probenspezifischen Effekt handeln. Für die Messungen wurde eine NADH-Konzentration von 0,85 mM gewählt. Diese befindet sich mit großer Sicherheit im Sättigungsbereich und der Blindwert für die nicht-enzymatisch katalysierte Reduktion von INT durch NADH lag mit einem Anteil von 25% an der Gesamtaktivität noch deutlich unter dem bei höheren Konzentrationen ($\geq 33\%$).

pH-Wert

Neben den Substratkonzentrationen spielt bei Messungen der Enzymaktivität auch der pH-Wert im Medium eine Rolle. Owens und King (1975), Kenner und Ahmed (1975) und G.-Toth et al. (1995) ermittelten die höchste ETS-Aktivität bei einem pH-Wert von 8,5. Dieser noch oberhalb des mitochondrialen pH-Wertes von etwa 8 liegt, es wurde daher getestet welchen Einfluß ein pH-Wert näher am physiologischen Bereich hat. Dazu wurden im Homogenisations- und Assaypuffer fünf verschiedene pH-Werte eingestellt und eine Meßreihe aufgenommen.

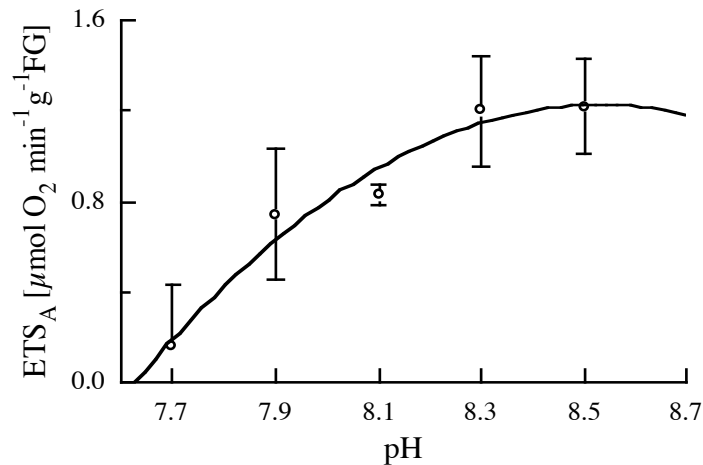


Abb. 3.4: Abhängigkeit der ETS-Aktivität vom pH-Wert im Medium. (MW \pm SD, n = 3; Gleichung der Regression: $ETS_A = 1,5 \text{ pH}^2 + 25,6 \text{ pH} - 107,9$; $r = 0,978$)

Die maximalen ETS-Aktivitäten wurden für pH 8,3 und 8,5 bestimmt. Bei niedrigeren pH-Werten zeigte sich eine deutliche Abnahme. Die gemessenen Aktivitäten ließen sich mit einer Regression zweiten Grades annähern. Deren Maximum lag bei einem pH-Wert von 8,5, was die Untersuchungen von Owens und King (1975), Kenner und Ahmed (1975) und G.-Toth et al. (1995) bestätigt. Für die Messungen wurde daher ein pH von 8,5 in den Puffern eingestellt.

1.1.3 Einfluß der Lagerung auf die ETS-Aktivität

Haltbarkeit des Extraktes

Für die Aufnahme der Temperaturabhängigkeit der ETS-Aktivität mussten die Proben bei verschiedenen Temperaturen gemessen werden. Für die entwickelten Bedingungen wurde daher im Rahmen der Vorversuche die Aktivitätsabnahme im Extrakt über die Zeit, bei einer Lagerung auf Eis, bestimmt.

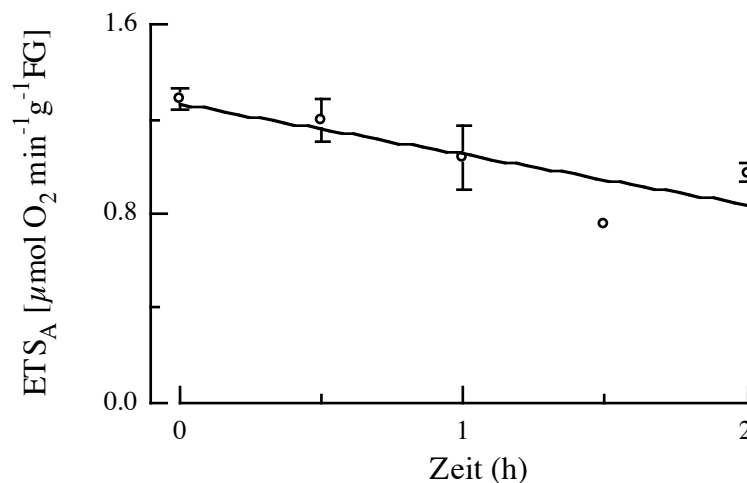


Abb. 3.5: Aktivitätsverlust im Extrakt über die Zeit. (MW \pm MA, n = 2; Gleichung der Regressionsgeraden: $ETS_A = -0,214 t + 1,264$; p = 0,0073, r = 0,784)

Der Extrakt zeigte einen deutlichen Aktivitätsverlust von 17% pro Stunde (= -0,214 $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG h}^{-1}$). Deshalb wurde für jede Temperatur ein frischer Extrakt hergestellt.

Lagerung der Proben bei -20°C

Die untersuchten Gewebe waren während der Überführung nach Bremerhaven einer Lagerung bei -20°C ausgesetzt. Um einen Einfluß auf die ETS-Aktivität auszuschließen wurde eine Zeitreihe für diese Temperatur aufgenommen. Die erste Messung erfolgte dabei an einer frisch entnommenen Muskelprobe, gleich nach dem schockgefrieren in flüssigem Stickstoff.

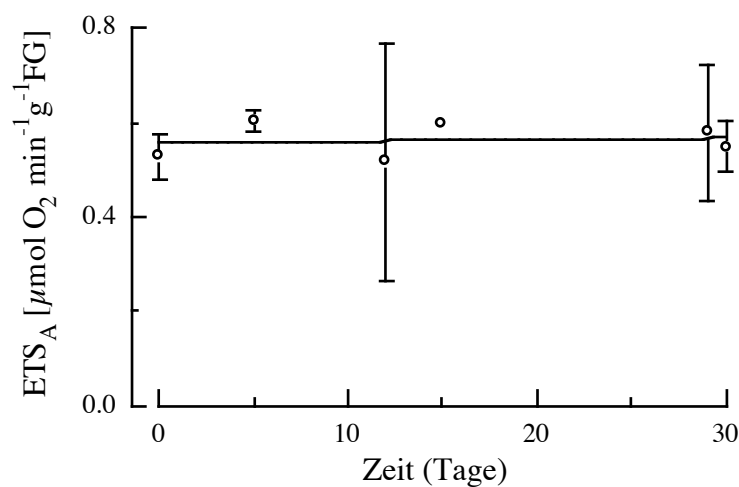


Abb. 3.6: Einfluß der Lagerung bei -20°C auf die ETS-Aktivität im weißen Muskel von Kabeljau. (MW \pm MA, n = 2; Gleichung der Regressionsgeraden: $ETS_A = 0,0003 t + 0,556$; p = 0,9005, r = 0,041)

Die ETS-Aktivität zeigte keine signifikante Abhängigkeit von der Dauer der Lagerung bei -20°C. Dies bestätigt die Ergebnisse von Ikeda (1989) für Fische des Mikronekton. Man kann daher davon ausgehen, daß bei dieser Temperatur keine Prozesse mehr ablaufen, welche die ETS-Aktivität negativ beeinflussen.

1.2 Überprüfung der ETS-Methode

1.2.1 Vergleich mit Aktivitäten anderer oxidativer Enzyme

Neben Messungen der ETS-Aktivität erfolgten in dieser Arbeit vergleichende Messungen der Cytochrom c-Oxidase (COX)-Aktivität im weißen Muskel und in der Leber der Dorsche aus den Wachstumsexperimenten. Zudem wurde an den Gewebeproben bei früheren Untersuchungen bereits die Aktivität der Citrat-Synthase (CS) bestimmt (Serendero-Krause, 2000 und A. Schmidt, pers. Mitteilung). Zur Überprüfung der Methode wurden die Aktivitäten des ETS mit denen dieser beiden Enzyme verglichen. In Abb. 3.7 und 3.8 sind die Ergebnisse für das ETS, die COX und die CS bei einer Meßtemperatur von 12°C dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden zum Vergleich der Akklimationstemperaturen (Abb. 3.7) die drei Populationen zu einer Gruppe zusammengefaßt und entsprechend für den Populationsvergleich (Abb. 3.8) die verschiedenen Hälterungstemperaturen. Da sich die CS-Aktivität nicht direkt in den Sauerstoffverbrauch umrechnen läßt und in erster Linie die Veränderung der Enzymaktivitäten mit der Temperatur bzw. der Population von Interesse war, wurden die Werte der einzelnen Enzyme in Prozent der maximalen Aktivität angegeben, die mit 100% gleichgesetzt wurde.

Im Vergleich der Akklimationstemperaturen (Abb.3.7) zeigten sich im weißen Muskel sehr ähnliche Veränderungen der drei Enzymaktivitäten, mit signifikant höheren Werten im unteren Temperaturbereich von 4°C (100%) bis 8°C gegenüber den hohen Hälterungstemperaturen (12 und 15°C). Dabei ließ sich bei der CS mit einer Abnahme bis auf $45,6 \pm 11,0\%$ aber eine stärkerer Einfluß der Temperatur feststellen als beim ETS ($64,9 \pm 16,4\%$) oder bei der COX ($70,6 \pm 17,2\%$). In der Leber konnte bei allen drei Enzymen ein Trend zur Zunahme der Aktivitäten mit der Hälterungstemperatur (15°C = 100%) beobachtet werden, wobei beim ETS der hohe Wert bei der 8°C-Hälterung $87,9 \pm 19,0\%$ diesen Trend deutlich abschwächt.

Beim Vergleich der Populationen (Abb. 3.8) zeigte sich im weißen Muskel nur bei der COX ein leichter Trend zu Abnahme der Aktivitäten mit zunehmender Hälterungstemperatur. In der Leber ließ sich dagegen bei allen drei Enzymen eine Abnahme der Aktivitäten in Richtung Süden beobachten, mit signifikant höheren Aktivitäten beim Nord-Ost-Arktischen (100%) gegenüber dem Nordseekabeljau bei allen drei Enzymen.

Fazit: Bei der Messung des Elektronen-Transport-Systems zeigten sich im Großen und Ganzen ähnliche Veränderungen der Aktivitäten in Abhängigkeit von der Akklimations-

temperatur und der Population wie bei den etablierten Messungen der Cytochrom c-Oxidase und der Citrat-Synthase.

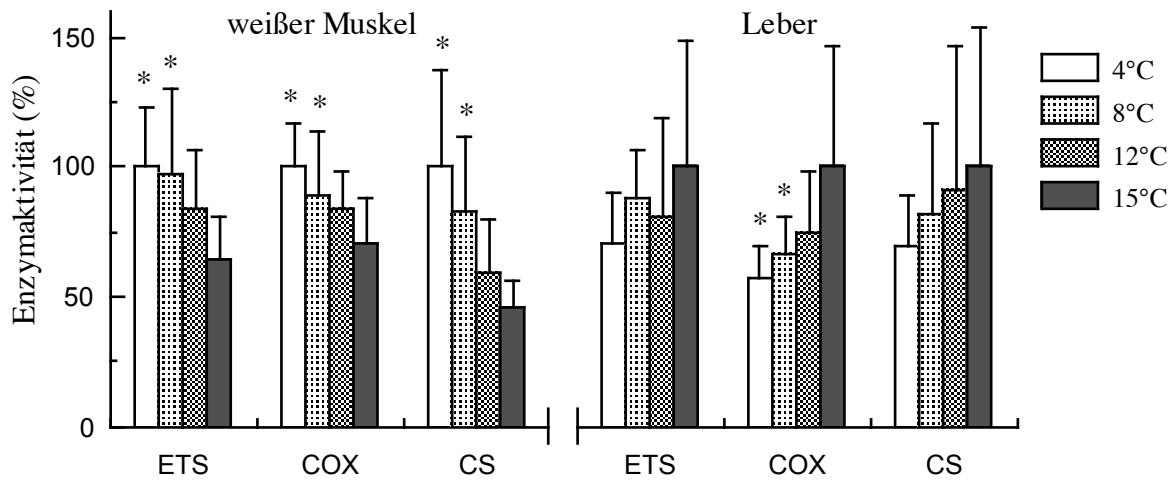


Abb. 3.7: Vergleich der Aktivitäten mitochondrialer Enzyme bei verschiedenen Akklimationstemperaturen, gemessen bei 12°C. Dargestellt sind die zusammengefassten Aktivitäten der drei Kabeljaupopulationen in Prozent vom Maximalwert. (MW \pm SD, *signifikanter Unterschied zur 15°C-Hälterung, ANOVA, Post-Hoc, ETS und COX: n = 14-24, CS: n = 9-21)

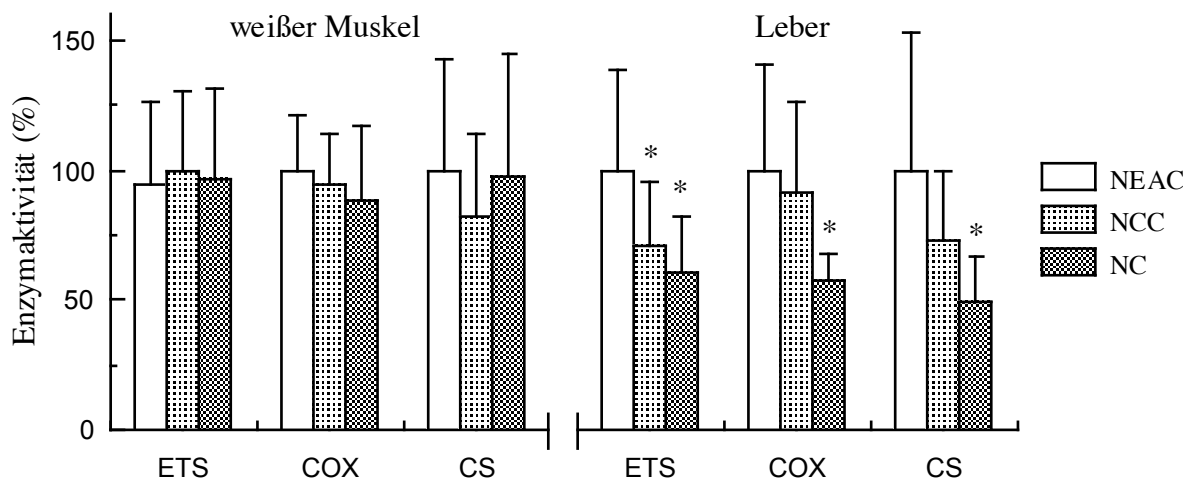


Abb. 3.8: Vergleich der Aktivitäten mitochondrialer Enzyme von drei Kabeljaupopulationen, gemessen bei 12°C. Dargestellt sind die zusammengefassten Aktivitäten aller Akklimationstemperaturen in Prozent vom Maximalwert. (MW \pm SD, *signifikanter Unterschied zum NEAC, ANOVA, Post-Hoc, ETS und COX: n = 19-31, CS: n = 9-34)

1.2.2 Korrelation der Aktivitäten des ETS, der COX und der CS

Zur weiteren Prüfung der ETS-Methode wurde getestet, ob die Ergebnisse aus der ETS-Messung in einer direkten Beziehung zu den COX- und CS-Aktivitäten stehen. Dazu wurden die Mittelwerte der Aktivitäten der COX und der CS für die 11 Kabeljaugruppen aus den verschiedenen Meßtemperaturen gegen den entsprechenden Mittelwert der ETS-Aktivität aufgetragen (Abb. 3.9) und die Regression berechnet. Die beste Korrelation zeigte sich dabei, wenn beide Werte ln-transformiert wurden, d. h. es lag eine exponentielle Beziehung vor.

Bei der COX (Abb. 3.9 oben) ließen sich keine Unterschiede zwischen den Aktivitäten im weißen Muskel und der Leber feststellen. Daher wurde hier nur eine Regressionsgleichung berechnet, in die die Ergebnisse beider Gewebe mit einbezogen wurden. Die Gerade besaß mit $r = 0,906$ ($p = 0,0001$) einen hohen Korrelationskoeffizienten, der auf eine starke Beziehung zwischen den beiden Enzymen hinweist. Der Exponent war mit $0,626 < 1$, die Kurve zeigte also einen konvexen Verlauf.

Bei der CS (Abb. 3.9 unten) zeigte sich, daß die Aktivitäten in der Leber deutlich unterhalb der im Muskel gemessenen Werte lagen. Es wurde daher jeweils eine Regressionsgleichung für den weißen Muskel und die Leber berechnet. Mit Korrelationskoeffizienten von $r = 0,650$ ($p = 0,0001$) für den Muskel und $r = 0,837$ ($p = 0,0013$) für die Leber wies die CS-Aktivität ebenfalls eine deutliche, wenn auch weniger starke Beziehung zur ETS-Aktivität auf, als die COX. Der Exponent für die CS-Aktivität im Muskel ist mit $0,383$ deutlich geringer als der der COX, d. h. die Kurve ist stärker gekrümmt. Bei der Leber hingegen unterscheidet sich der Exponent mit $1,049$ nicht signifikant von 1 , die Korrelation ist also nahezu linear

Fazit: Beide Vergleichsenzyme zeigten eine starke Beziehung zur ETS-Aktivität, die die gleichgerichteten Veränderungen, die im direkten Vergleich der Aktivitäten beobachtet wurden, bestätigt.

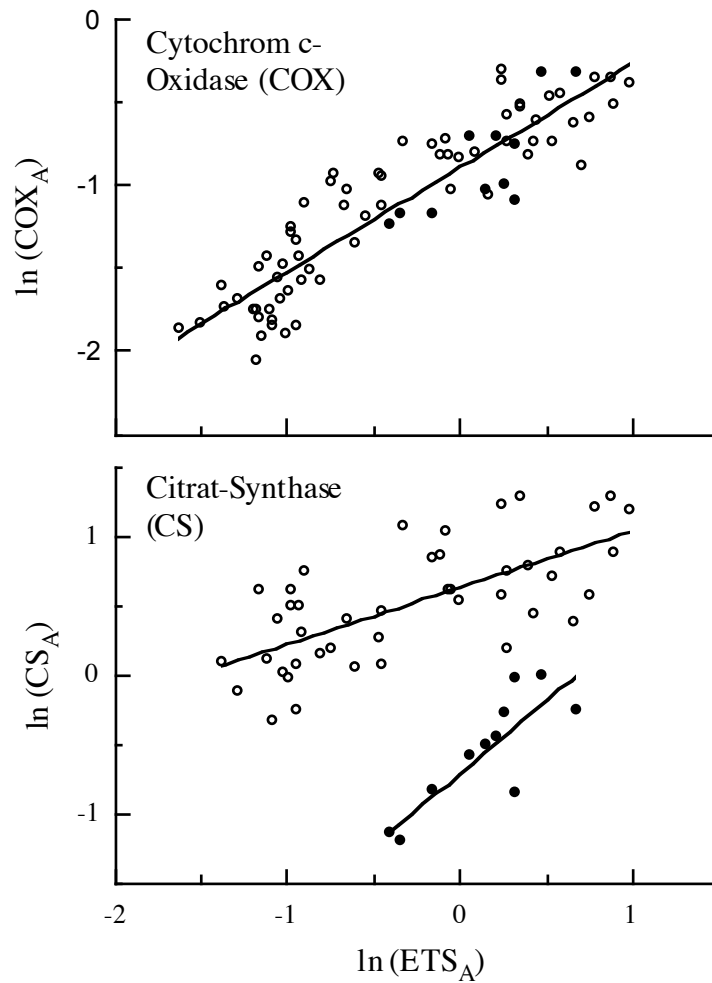


Abb. 3.9: Korrelation der COX- und CS-Aktivitäten zur ETS-Aktivität in verschiedenen Geweben beim Kabeljau (MW, Muskel (○): $n = 66$ für COX und $n = 45$ für CS, Leber (●): $n = 11$; Gleichungen der Regressionen:

$$COX_A = 0,409 ETS_A^{0,626}; p = 0,0001, r = 0,906$$

$$CS_A (\text{Muskel}) = 1,852 ETS_A^{0,383}; p = 0,0001, r = 0,650$$

$$CS_A (\text{Leber}) = 0,495 ETS_A^{1,049}; p = 0,0013; r = 0,837$$

1.3 Aerobe Kapazität der Gewebe

1.3.1 Enzymaktivitäten im weißen Muskel

Aktivität des Elektronen-Transport-Systems

Die ETS-Aktivität in den Muskelproben wurde bei 2, 5, 8, 12, 15 und 18°C gemessen und zeigte eine exponentielle Zunahme mit ansteigender Meßtemperatur (Abb. 3.7).

Beim Arktischen Kabeljau (NEAC) zeigte sich im Vergleich der Akklimationstemperaturen (Abb. 3.10), daß die bei 12°C gehälterten Fische die signifikant höchsten und die bei 15°C gehälterten Tiere die signifikant niedrigsten Aktivitäten aufwiesen. Bei der norwegischen Population (NCC) lag die ETS-Aktivität der bei 15°C „akklimierten“ Fische signifikant unterhalb der der 8°C-Hälterung. Sie war ebenfalls gegenüber den Werten der bei 4 und 12°C „akklimierten“ Tiere erniedrigt, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p < 0,1$). Der Nordseekabeljau (NC) schließlich zeigte bei 4 und 8°C gehältert jeweils signifikant höhere Aktivitäten als bei 12 und 15°C.

Beim Vergleich der Populationen (Abb. 3.11) ließen sich bei den bei 4, 8 und 15°C „akklimierten“ Gruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden borealen Populationen feststellen. Die arktische Population wies hier, soweit vorhanden, die geringsten Aktivitäten auf, bei 8°C signifikant verschieden zum Nordseekabeljau und bei 15°C signifikant niedriger als beim NCC und NC. Bei der 12°C-Hälterung zeigten dagegen die beiden kalt-adaptierten Populationen höhere Aktivitäten als der Nordseekabeljau, dabei ist aber nur der Unterschied zum NCC signifikant.

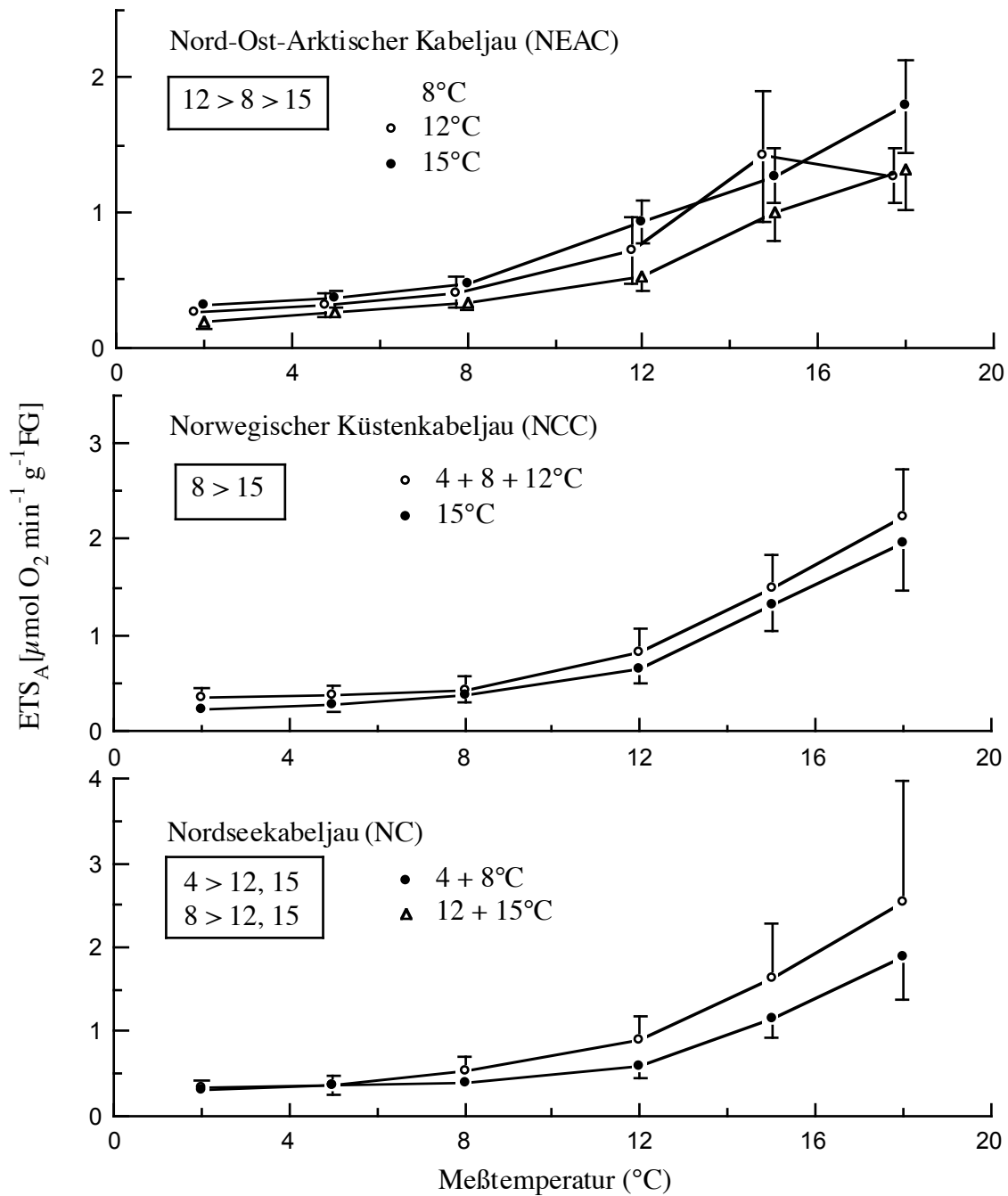


Abb. 3.10: Vergleich der Hälterungstemperaturen für die ETS-Aktivität im weißen Muskel von drei Kabeljau-populationen in Abhängigkeit von der Meßtemperatur. (MW \pm SD, $x > y$: signifikanter Unterschied zwischen den Hälterungstemperaturen, ANCOVA, Contrasts, $n = 6-8$; benachbarte Hälterungstemperaturen, deren Werte sich nicht signifikant unterschieden wurden zur besseren Übersicht zusammengefasst; Meßtemperaturen: 2, 5, 8, 12, 15 und 18°C, um Überschneidungen in der Darstellung zu vermeiden wurden z. T. abweichende Bezugstemperaturen gewählt)

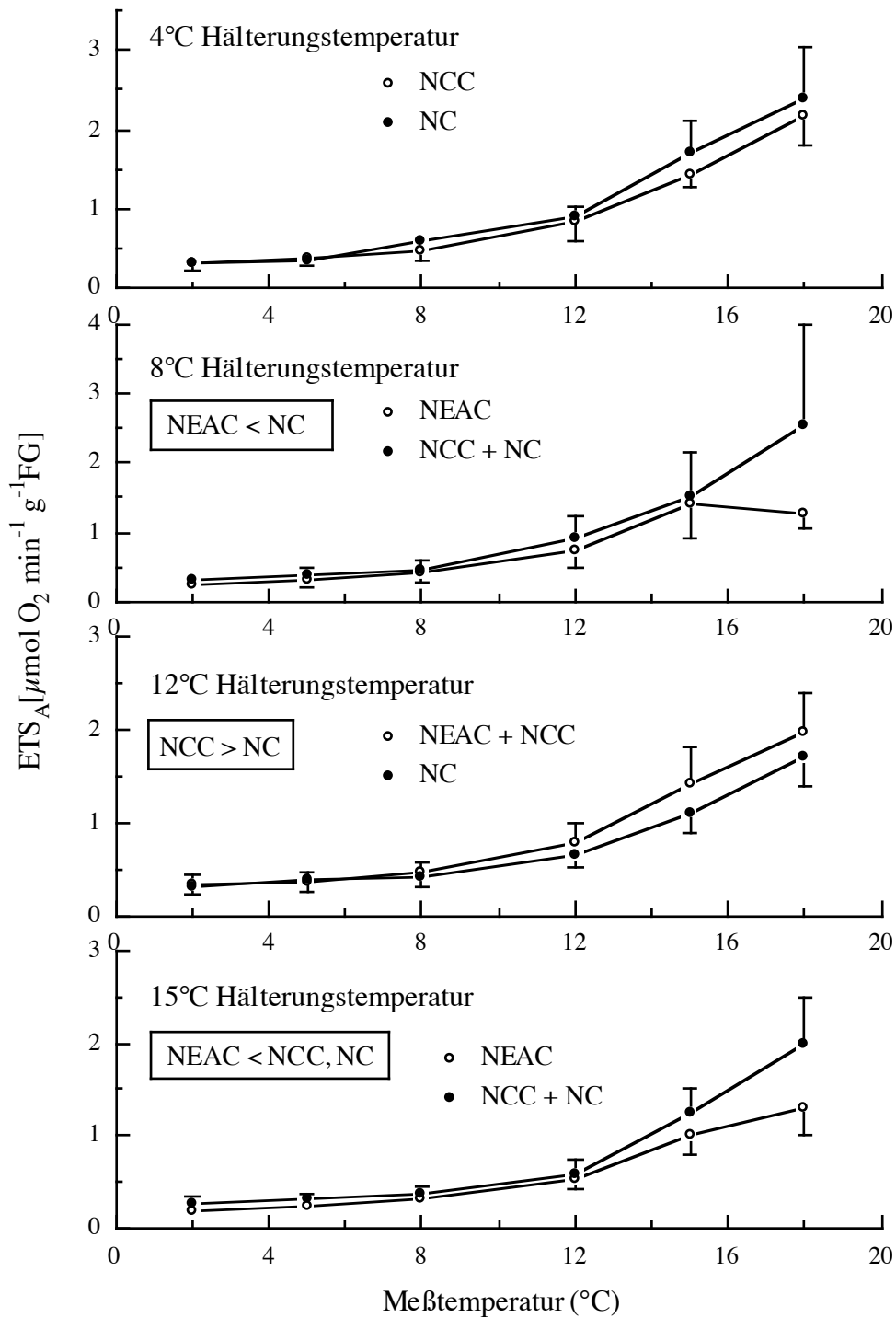


Abb. 3.11: Vergleich der Kabeljaupopulationen für die ETS-Aktivität im weißen Muskel bei verschiedenen Hälterungstemperaturen in Abhängigkeit von der Meßtemperatur. (MW \pm SD, $x > y$: signifikanter Unterschied zwischen den Populationen, ANCOVA, Contrasts, $n = 6-8$; Darstellung wie in Abb. 3.10)

Aktivität der Cytochrom c-Oxidase

Wie bei der ETS-Messung wurde auch die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase (COX) in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Sie zeigte dabei ebenfalls eine exponentielle Zunahme mit der Temperatur (Abb. 3.12), die Temperatursensitivität war aber geringer als die des ETS.

Der Vergleich der Akklimationstemperaturen (Abb. 3.12) ergab für die arktischen Population signifikant höhere COX-Aktivitäten bei der 8 und 12°C-Hälterung als bei der 15°C-Hälterung. Beim norwegischen Kabeljau zeigte die Akklimation bei 4°C signifikant höhere Werte als die bei den höheren Temperaturen (8 bis 15°C). Bei den Nordseetieren nahm die COX-Aktivität mit steigender Hälterungstemperatur ab. Dabei unterschieden sich, mit Ausnahme von 4 und 8°C, alle Akklimationstemperaturen signifikant.

Im Populationsvergleich (Abb. 3.13) zeigten sich bei der 4°C-Hälterung keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden borealen Vertretern. Bei den an 8°C „akklimierten“ Tieren wies die norwegischen Population signifikant geringere Aktivitäten auf, als die beiden anderen. Die Aktivitäten beim arktischen Kabeljau lagen über denen der Nordseetiere, sie unterschieden sich aber nicht signifikant. Bei der optimalen Wachstumstemperatur von 12°C ließen sich beim NEAC signifikant höhere Werte als bei den beiden borealen Populationen feststellen und bei der 15°C-Hälterung erreichten die arktischen und die norwegischen Tiere signifikant höhere Aktivitäten als die aus der Nordsee.

Fazit: Der Vergleich der Hälterungstemperaturen zeigte bei beiden Enzymen ein Trend zu höheren Enzymaktivitäten bei den kalt-„akklimierten“ Tieren gegenüber den warm-„akklimierten“ Gruppen. Dabei muß bei der arktischen Population die Einschränkung gemacht werden, daß hier wegen der fehlenden 4°C-Akklimation das Bild weniger eindeutig ist, als bei den borealen Populationen. Beim Vergleich der Populationen ließen sich dagegen keine einheitlichen Trends bei den beiden Enzymen feststellen. Beim ETS ließ sich keine eindeutige Abhängigkeit der Aktivität von der Population feststellen, während bei der COX der arktische Kabeljau die höchsten Aktivitäten zeigte.

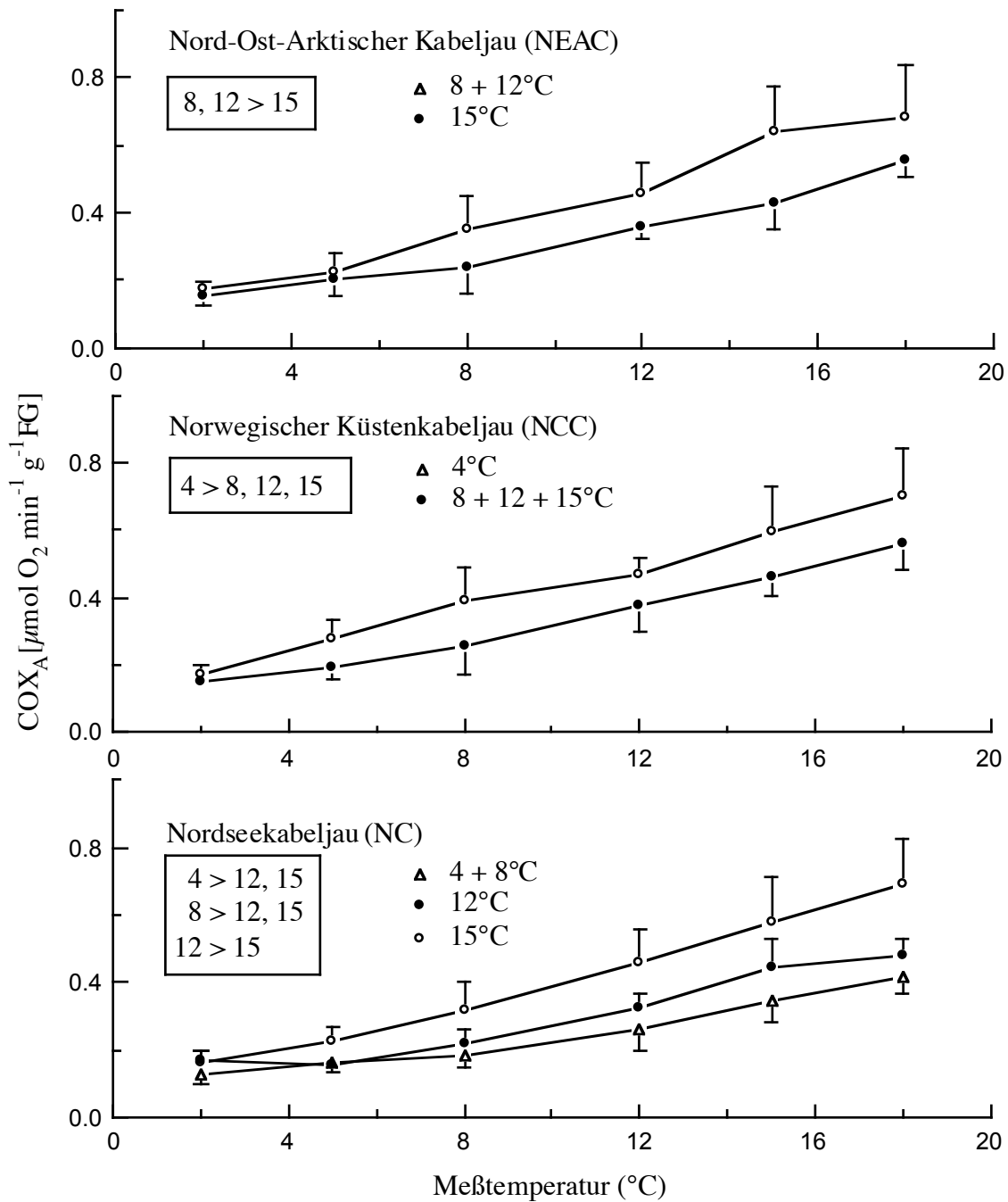


Abb. 3.12: Vergleich der Hälterungstemperaturen für die COX-Aktivität im weißen Muskel von drei Kabeljau-populationen in Abhängigkeit von der Meßtemperatur. (MW \pm SD, $x > y$: signifikanter Unterschied zwischen den Hälterungstemperaturen, ANCOVA, Contrasts, $n = 5-8$; Darstellung wie in Abb. 3.10)

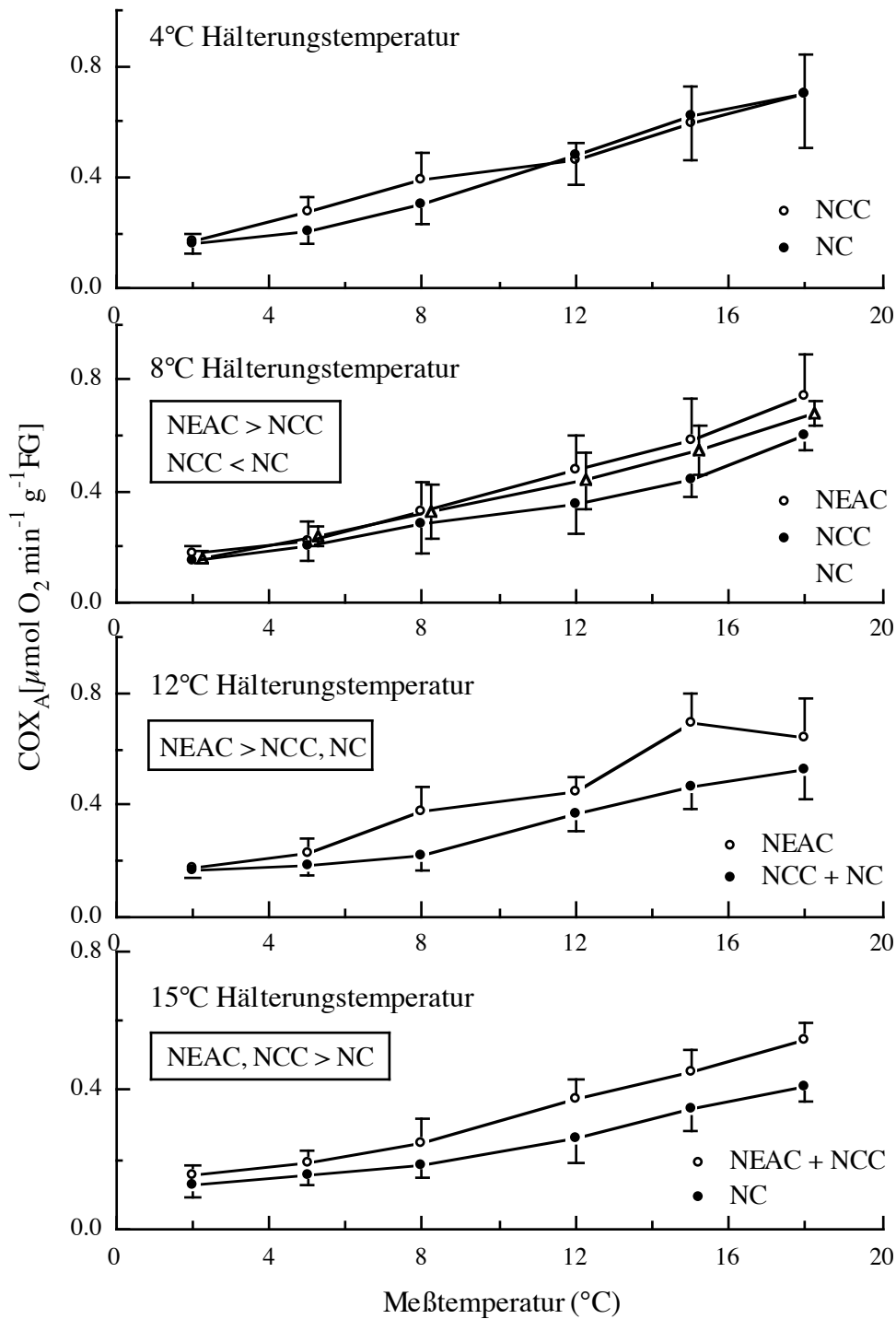


Abb. 3.13: Vergleich der Kabeljaupopulationen für die COX-Aktivität im weißen Muskel bei verschiedenen Hälterungstemperaturen in Abhängigkeit von der Meßtemperatur. (MW ± SD, x > y: signifikanter Unterschied zwischen den Populationen, ANCOVA, Contrasts, n = 5-8; Darstellung wie in Abb. 3.10)

1.3.2 Enzymaktivitäten in der Leber

Hepatosomatischer Index

Der Hepatosomatische Index (HSI), der den Anteil des Lebergewichts am Gesamtgewicht eines Tieres angibt, kann einen Einfluß auf die Enzymaktivitäten in der Leber haben. Für die untersuchten Kabeljaugruppen lag der HSI (Tab. 3.3, pers. Mitteilung T. Fischer und T. Johansen) zwischen $3,90 \pm 2,00$ und $10,80 \pm 0,91$ und zeigte signifikant höhere Werte beim Nordseekabeljau und einen Trend zur Abnahme mit steigender Hälterungstemperatur bei der arktischen und der norwegischen Population.

Tab. 3.3: Hepatosomatischer Index (HSI) der untersuchten Tiere aus drei Kabeljaupopulationen bei verschiedenen Akklimationstemperaturen. (MW \pm SD, *signifikanter Unterschied zu den übrigen Populationen, ANCOVA, Contrasts, n = 4-8)

Akklimations- temperatur (°C)	Hepatosomatischer Index		
	NEAC	NCC	NC*
4		$8,52 \pm 1,60$	$8,92 \pm 2,22$
8	$6,60 \pm 3,30$	$8,51 \pm 1,17$	$10,50 \pm 1,39$
12	$6,02 \pm 3,11$	$7,20 \pm 2,60$	$10,80 \pm 0,91$
15	$3,90 \pm 2,00$	$5,40 \pm 2,58$	$9,96 \pm 1,23$

Aktivität des Elektronen-Transport-Systems

Die Messung der Leberproben erfolgte bei 12°C, der Temperatur, die dem Optimum für das Wachstum bei den drei Kabeljaupopulationen am nächsten kommt. Im Vergleich zu den bei 12°C gemessenen ETS-Aktivitäten im weißen Muskel lagen die Werte in der Leber im Mittel um den Faktor 1,2 bis 2,1 höher.

Bei einem Vergleich der ETS-Aktivitäten in der Leber in Abhängigkeit von der Hälterungstemperatur (Abb. 3.14) zeigten sich beim NEAC keine signifikanten Unterschiede, es ließ sich aber ein Trend zur höheren Aktivität bei den bei 15°C „akklimierten“ Tieren gegenüber 8 und 12°C feststellen. Beim norwegischen Kabeljau fand sich ebenfalls eine Zunahme der ETS-Aktivitäten mit steigender Akklimationstemperatur, wobei sich die 15°C-Hälterung signifikant von den übrigen unterschied. Dagegen zeigten sich beim Nordseekabeljau signifikant höhere Aktivitäten bei den bei 4 und 8°C gehälterten Tieren als bei denen aus 12 und 15°C, also eine Abnahme der ETS-Aktivität von den kalt- zu den warm-„akklimierten“ Tieren hin.

Beim Vergleich der Populationen (Abb. 3.14) unterschieden sich der arktische und der norwegische Kabeljau bei keiner Hälterungstemperatur signifikant. Die Aktivitäten in der Leber der Nordseetiere waren bei den beiden unteren Hälterungstemperaturen (4 und 8°C) ebenfalls nicht signifikant verschieden von denen der beiden anderen Populationen. Bei den höheren Temperaturen (12 und 15°C) waren sie aber, auf Grund des gegenläufigen Verhaltens in Abhängigkeit von der Hälterungstemperatur, signifikant niedriger.

Die Zunahme der ETS-Aktivitäten bei der arktischen und der norwegischen Population gingen mit einer Abnahme des HSI einher. Dagegen veränderte sich der HSI beim Nordseekabeljau, der eine Abnahme der Aktivitäten bei den hohen Hälterungstemperaturen zeigte, nur geringfügig. Bei einer Auftragung der ETS-Aktivitäten der einzelnen Fische gegen den entsprechenden HSI (Abb. 3.15) konnte eine signifikante lineare Korrelation ($p = 0,0001$; $r = 0,703$) ermittelt werden, wobei die ETS-Aktivitäten mit steigendem HSI abnahmen.

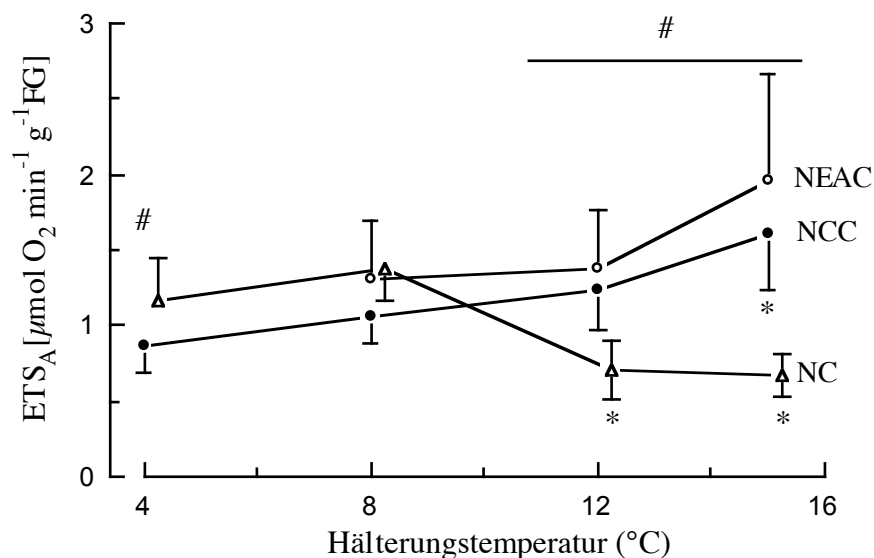


Abb. 3.14: ETS-Aktivität in der Leber von drei Kabeljaupopulationen in Abhängigkeit von der Hälterungstemperatur. (MW \pm SD, *signifikanter Unterschied zu den kalt-,akklimierten Tieren (4 und 8°C), #Bereich mit signifikanten Unterschieden zu NC, ANOVA, Post-Hoc, $n = 4-8$; Hälterungstemperaturen: 4, 8, 12 und 15°C, um Überschneidungen in der Darstellung zu vermeiden wurden z. T. abweichende Bezugstemperaturen gewählt)

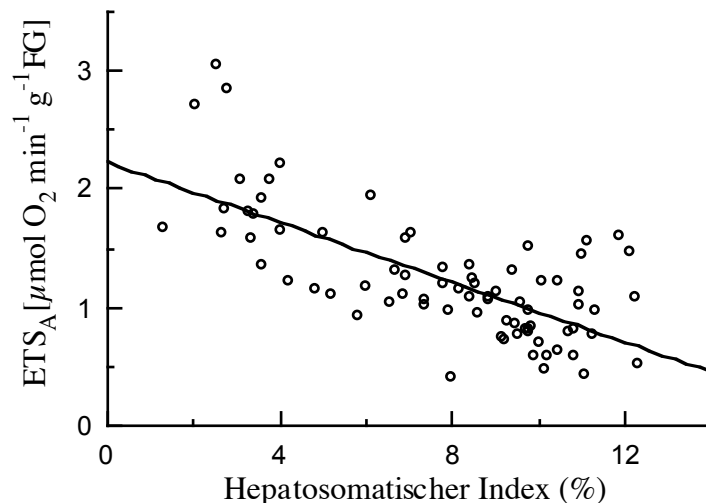


Abb. 3.15: Korrelation der ETS-Aktivität in der Leber zum Hepatosomatischen Index. (MW \pm SD, n = 77; Gleichung der Regressionsgeraden: $ETS_A = -0,126 HSI + 2,223$; $p = 0,0001$, $r = 0,703$)

Aktivität der Cytochrom c-Oxidase

Die COX-Aktivitäten in der Leber waren maximal um den Faktor 1,5 höher als im weißen Muskel, lagen also im gleichen Größenbereich.

Beim Vergleich der Akklimationstemperaturen für die COX-Aktivität in der Leber (Abb. 3.16) konnte für die arktische Population ein Trend zur Zunahme der Aktivitäten mit steigender Temperatur festgestellt werden, wobei sich die 8 und die 15°C-Hälterung signifikant unterschieden. Bei den norwegischen Tieren zeigte sich ein ähnlicher Trend, mit einem signifikant höheren Wert bei der 15°C-Hälterung gegenüber den übrigen Akklimationstemperaturen. Beim Nordseekabeljau ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hälterungen erkennen, es zeigte sich aber einen Trend zur Abnahme der COX-Aktivität mit steigender Temperatur.

Beim Vergleich der Populationen (Abb. 3.16) zeigten sich zwischen den arktischen und den norwegischen Tieren bei keiner der Hälterungstemperaturen signifikante Unterschiede. Der Nordseekabeljau zeigte bei 8°C eine signifikant niedrigere COX-Aktivität als der Norwegische Küstenkabeljau und bei 12 und 15°C signifikant geringere Werte als beide kaltangepassten Populationen.

Wie schon beim ETS zeigte sich auch bei der Auftragung der COX-Aktivitäten gegen den zugehörigen Hepatosomatischen Index (Abb. 3.17) eine signifikante lineare Korrelation ($p = 0,0001$; $r = 0,795$), mit einer Abnahme der Enzymaktivitäten bei steigendem HSI.

Fazit: Die Messungen der Aktivitäten des Elektronen-Transport-Systems und der Cytochrom c-Oxidase in der Leber des Kabeljaus lieferten sehr ähnliche Ergebnisse. Bei den beiden nominell stenothermen Populationen aus der Nord-Ost-Arktis und West-Norwegen zeigte sich eine Zunahme der Aktivitäten mit steigender Akklimationstemperatur, während bei den eher eurythermen Tieren aus der Nordsee die Aktivitäten abnahmen. Im Bereich der Lebensraumtemperaturen (4 und 8°C) lagen die Werte bei allen drei Population im allgemeinen in der gleichen Größenordnung, bei den hohen Hälterungstemperaturen jedoch wies der Nordseekabeljau geringere Aktivitäten auf als die beiden anderen Populationen. Neben der Abhängigkeit von den Akklimations- und Habitattertemperaturen konnte außerdem eine inverse Beziehung der Enzymaktivitäten zum HSI ermittelt werden.

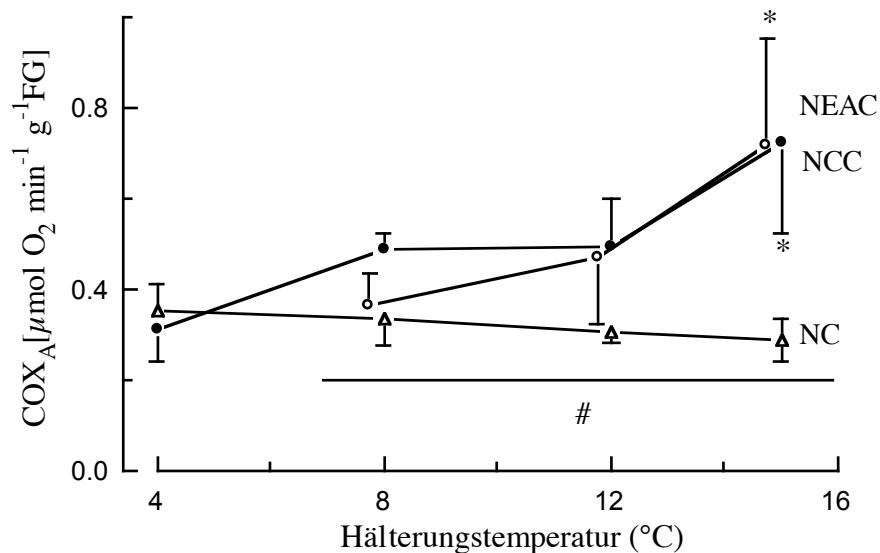


Abb. 3.16: COX-Aktivität in der Leber von drei Kabeljaupopulationen in Abhängigkeit von der Hälterungstemperatur. (MW ± SD, *signifikanter Unterschied zu den kalt-„akklimierten“ Tieren (4 und 8°C), #Bereich mit signifikanten Unterschieden zu NC, ANOVA, Post-Hoc, Darstellung wie in Abb. 3.14)

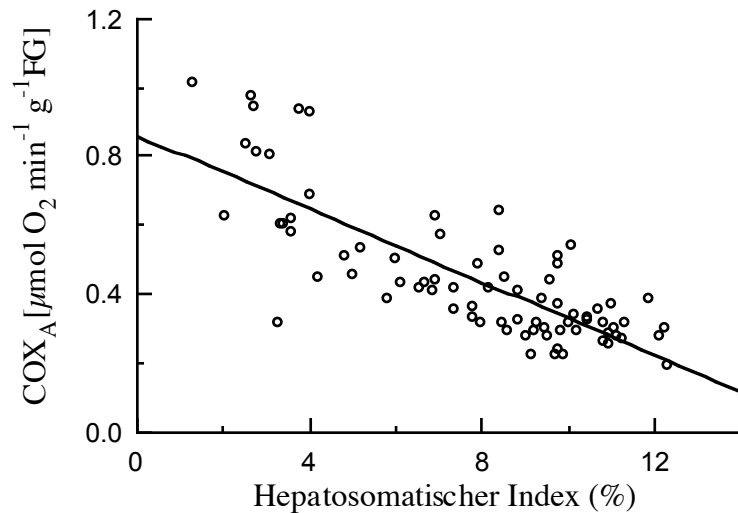


Abb. 3.17: Korrelation der COX-Aktivität in der Leber zum Hepatosomatischen Index. (MW, n = 77; Gleichung der Regressionsgeraden: $COX_A = -0,053 HSI + 0,861$; $p = 0,0001$, $r = 0,795$)

1.4 Temperaturabhängige Eigenschaften der Enzyme

1.4.1 Arrhenius-Analyse und Q_{10} -Werte für das ETS

Bei den Arrhenius-Darstellungen für das Elektronen-Transport-System (Abb. 3.18a und b) zeigten sich bei den beiden borealen Populationen, mit Ausnahme des bei 15°C gehälterten norwegischen Kabeljaus, durchgängig signifikante Diskontinuitäten in der Steigung. Die Arrhenius-Break-Temperaturen (ABT) lagen im Bereich von $6 \pm 2^\circ\text{C}$ bis $11 \pm 2^\circ\text{C}$ (Tab. 3.4), es konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Populationen oder den Akklimationstemperaturen festgestellt werden. Lediglich beim Nordseekabeljau ließ sich ein Trend zur Verschiebung der ABT nach oben, bei steigender Hälterungstemperatur vermuten. Bei der arktischen Population zeigten sich keine signifikanten Diskontinuitäten in der Steigung der Arrheniusplots.

Tab. 3.4: Arrhenius-Break-Temperaturen für das Elektronen-Transport-System im weißen Muskel von Norwegischem Küstenkabeljau (NCC) und Nordseekabeljau (NC). (MW \pm SD, keine signifikanten Unterschiede, ANOVA, Post-Hoc, n = 4-7, –/– keine ABT vorhanden)

Akklimations- temperatur ($^\circ\text{C}$)	Arrhenius-Break-Temperaturen ($^\circ\text{C}$)	
	NCC	NC
4	8 ± 2	8 ± 3
8	6 ± 2	9 ± 3
12	10 ± 2	10 ± 2
15	–/–	11 ± 2

Die diskontinuierlichen Arrheniusplots für das ETS wiesen einen konkaven Verlauf auf, mit einem flachen Abschnitt unterhalb (niedrige Meßtemperaturen) und einem steileren Bereich oberhalb der ABT (hohe Meßtemperaturen). Die Steigung oberhalb der ABT ($x - y$) lag dabei in der gleichen Größenordnung wie die der kontinuierlichen Plots, während die Steigung unterhalb ($y - z$) signifikant niedriger war. Die Bezeichnungen sind in Abb. 3.18b am Beispiel des bei 15°C gehälterten Nordseekabeljaus verdeutlicht.

Entsprechend den Diskontinuitäten in der Arrhenius-Darstellung waren auch die Q_{10} -Werte für das ETS nicht über den gesamten Meßtemperaturbereich konstant. Sie wurden daher in zwei Temperaturabschnitten ermittelt, in denen sich bei allen Gruppen ein kontinuierlicher Verlauf zeigte. Dabei lagen die Q_{10} -Werte im Bereich der unteren Meßtemperaturen (2 – 8°C) in einer physiologisch üblichen Größenordnung (Abb. 3.19), während die für die oberen Meßtemperaturen (12 – 18°C) ermittelten Ergebnisse mit $3,46 \pm 1,15$ bis $9,95 \pm 4,48$ deutlich erhöht waren (Tab. im Anhang).

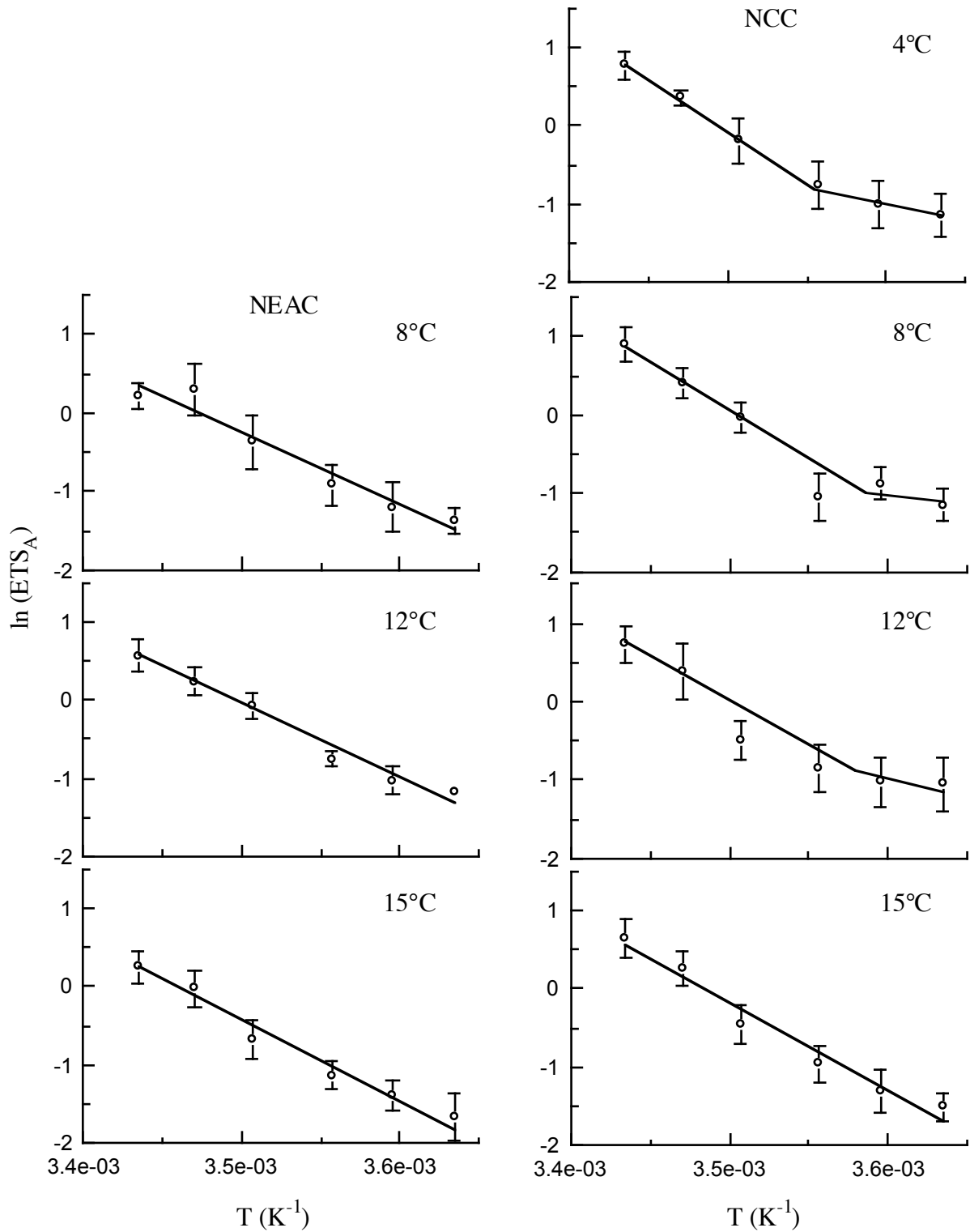


Abb. 3.18a: Arrhenius-Darstellung der ETS-Aktivitäten im weißen Muskel des Nord-Ost-Arktischen (NEAC) und des Norwegischen Küstenkabeljaus (NCC) für die jeweiligen Hälterungstemperaturen. (MW \pm SD, n = 6-8; durchgezogene Linie: Regressionsgerade)

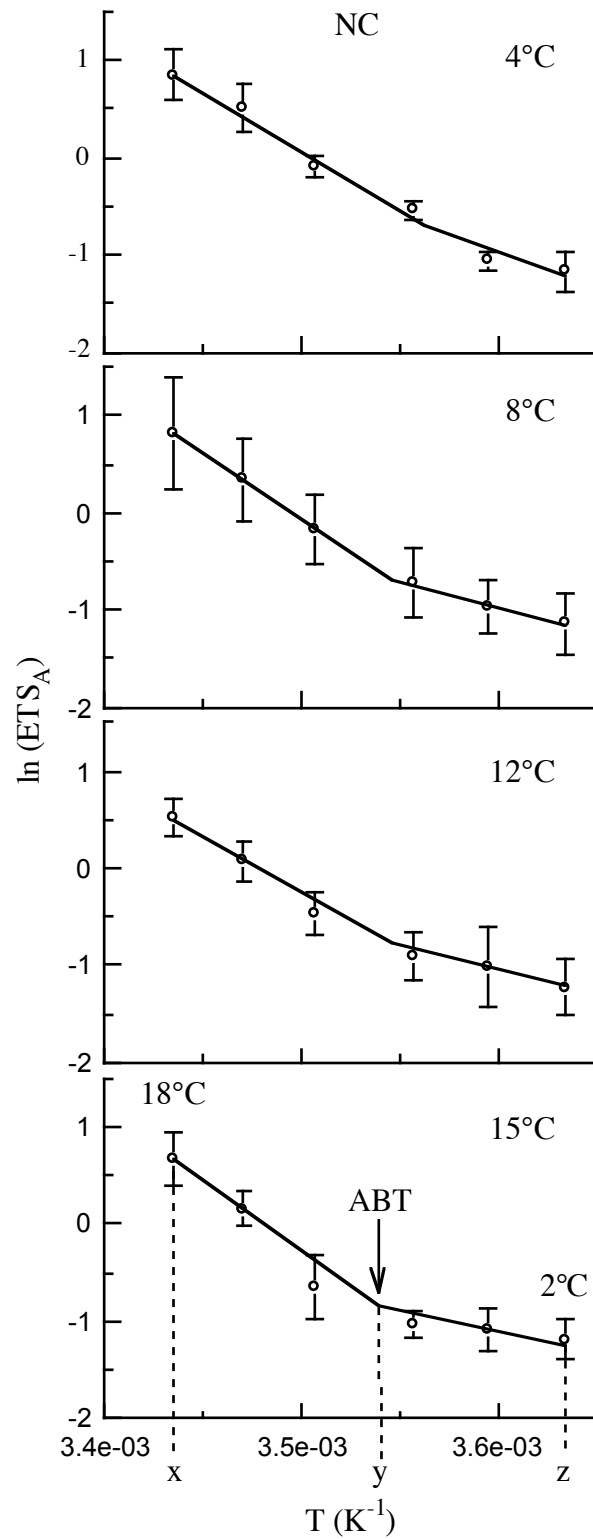


Abb. 3.18b: Arrhenius-Darstellung der ETS-Aktivitäten im weißen Muskel des Nordseekabeljaus (NC) für die jeweiligen Hälterunstemperaturen. (MW \pm SD, n = 5-8; durchgezogene Linie: Regressionsgerade)

Der Vergleich der Q_{10} -Werte und der Aktivierungsenergien (Abb. 3.19) erfolgt mit den Werten die im unteren Temperaturbereich bestimmt wurden, da dieser etwa der natürlichen Lebensraumtemperatur des Kabeljaus ($\leq 10^\circ\text{C}$) entspricht. Zu den Aktivierungsenergien im oberen Temperaturbereich (y – z) sei noch erwähnt, daß sie mit Werten zwischen $93,97 \pm 39,49$ bis $119,99 \pm 54,03 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Tab. im Anhang) noch oberhalb der E_a -Werte der kontinuierlichen Plots lagen und daß sich hier keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Hälterungstemperaturen oder der Populationen feststellen ließen.

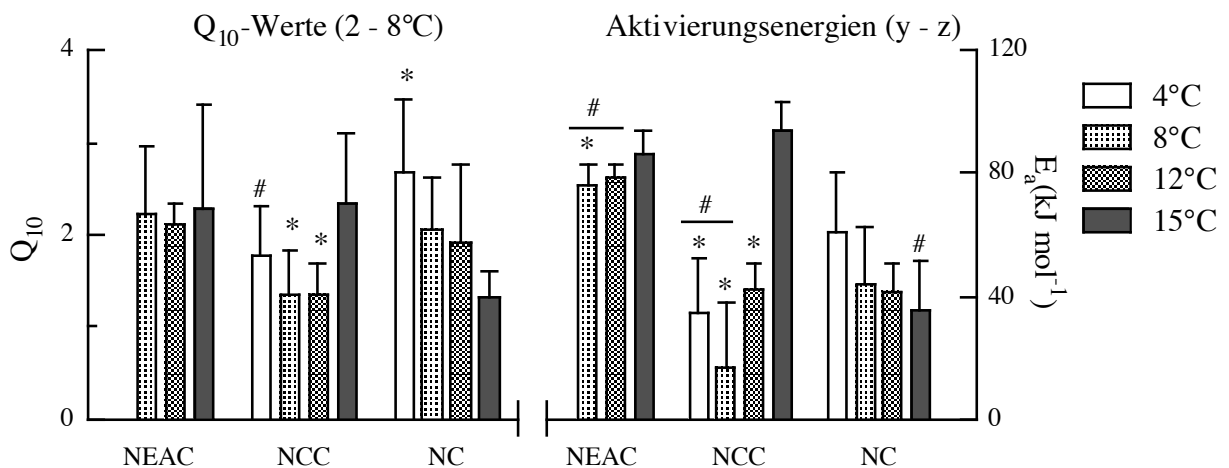


Abb. 3.19: Q_{10} -Werte und Arrhenius-Aktivierungsenergien für das ETS im weißen Muskel von Kabeljau in Abhängigkeit von der Population und der Akklimationstemperatur. (MW \pm SD, *signifikanter Unterschied zur 15°C-Hälterung, #signifikanter Unterschied zu den übrigen Populationen, ANOVA, Post-Hoc, n = 5-8; Temperaturbereich (y – z): 2 – 8°C (4 und 8°C-Hälterung, 2 – 12°C (12 und 15°C-Hälterung) oder 2 – 18°C (NEAC und 15°C-Hälterung für NCC))

Es zeigten sich in Abhängigkeit von der Akklimationstemperatur, bei der arktischen Population nur geringfügige Veränderungen, obwohl sich die Aktivierungsenergien der bei 8°C und bei 15°C gehälterten Gruppe signifikant unterschieden. Bei den Q_{10} -Werten fanden sich dagegen keine signifikanten Unterschiede. Beim Norwegischen Küstenkabeljau ließen sich zwischen den unteren Hälterungstemperaturen (4 bis 12°C) keine signifikanten Unterschiede feststellen. Die Q_{10} -Werte lagen hier, ebenso wie die Aktivierungsenergien, auf einem gleichmäßig niedrigen Niveau. Dagegen zeigten sich bei den bei 15°C gehälterten Fischen signifikant höhere Werte als bei den kalt-„akklimierten“ Tieren. Beim Nordseekabeljau zeigte sich ein Trend zur Abnahme der E_a - und Q_{10} -Werte mit steigender Hälterungstemperatur, wobei sich nur für den Q_{10} ein signifikanter Unterschied zwischen der 4 und der 15°C-Hälterung feststellen ließ.

Beim Vergleich der Populationen für die Aktivierungsenergien zeigte der Nord-Ost-Arktische Kabeljau durchgängig signifikant höhere Werte als die Nordseetiere und bei der 8 und 12°C-Hälterung auch als die norwegischen Population. Bei 4 und 8°C waren die Werte

des Norwegischen Küstenkabeljaus signifikant niedriger, und bei 15°C signifikant höher als die des Nordseekabeljaus. Bei den Q_{10} -Werten zeigte sich ein ähnliches Bild, die Unterschiede waren jedoch mit Ausnahme der 4°C-Hälterung nicht signifikant.

Fazit: Bei der nominell stenothermen arktischen Population zeigten sich keine ABT und die Q_{10} -Werte und Aktivierungsenergien blieben von der Akklimationstemperatur weitgehend unbeeinflusst. Beim Norwegischen Küstenkabeljau waren die Werte bei den unteren Hälterungstemperaturen (4 bis 12°C) weitgehend konstant, aber signifikant niedriger als beim NEAC, des weiteren konnten hier ABT festgestellt werden. Bei 15°C fand sich dagegen keine ABT und deutlich erhöhte Werte. Beim eher eurythermen Nordseekabeljau konnten durchgängig diskontinuierliche Arrheniusplots beobachtet werden und es zeigte sich ein Trend zur Aufwärtsverschiebung der ABT mit steigender Akklimationstemperatur. Die E_a - und Q_{10} -Werte lagen in der gleichen Größenordnung wie die der kalt-„akklimierten“ norwegischen Tiere und zeigten einen Trend zur Abnahme mit steigender Hälterungstemperatur.

1.4.2 Arrhenius-Analyse und Q_{10} -Werte für die COX

Bei den Arrhenius-Darstellungen für die Cytochrom c-Oxidase zeigten sich keine signifikanten Diskontinuitäten in der Steigung, es waren keine ABT vorhanden. Dementsprechend waren auch die Q_{10} -Werte über den gesamten Meßtemperaturbereich konstant.

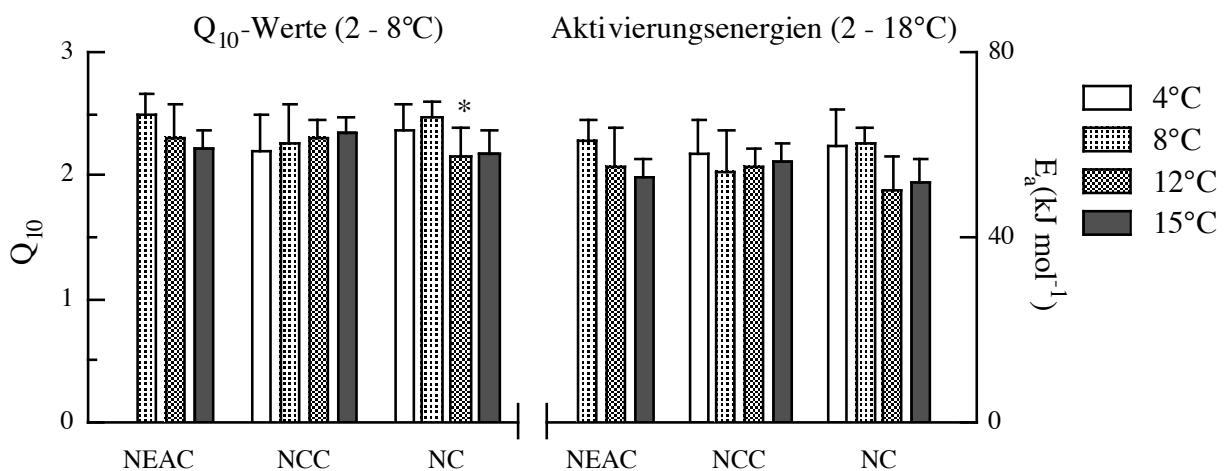


Abb. 3.20: Q_{10} -Werte und Arrhenius-Aktivierungsenergien für die COX im weißen Muskel von Kabeljau in Abhängigkeit von der Population und der Akklimationstemperatur. (MW \pm SD, *signifikanter Unterschied zur 8°C-Hälterung, ANOVA, Post-Hoc, n = 5-8)

Die Q_{10} -Werte und Arrhenius-Aktivierungsenergien für die COX (Abb. 3.20) lagen in einem sehr engen Bereich. Ein signifikanter Unterschied fand sich nur bei den Q_{10} -Werten für den Nordseekabeljau zwischen der 8 und der 12°C-Hälterung. Ansonsten ließen sich weder

für den Q_{10} noch für die Aktivierungsenergien signifikante Unterschiede zwischen den Akklimationstemperaturen oder den Populationen feststellen und auch einheitliche Trends waren nicht zu beobachten.

Fazit: Die Q_{10} -Werte und die Aktivierungsenergien der Cytochrom c-Oxidase im weißen Muskel von Kabeljau zeigten keine Abhängigkeit von der Population und blieben auch von der Akklimationstemperatur weitgehend unbeeinflusst.

2 Diskussion

Eine Exposition an niedrige Umgebungstemperaturen führt bei ektothermen Organismen wie Fischen zu verminderten Stoffwechselraten und erfordert eine entsprechende Anpassung des Metabolismus. Der Einfluß einer langfristigen Anpassung an verschiedene Lebensraumtemperaturen (Adaptation) auf den Stoffwechsel und die Möglichkeiten der Kompensation von Veränderungen der Umgebungstemperatur unter Laborbedingungen (Akklimation) sollte in der vorliegenden Arbeit am Kabeljau (*Gadus morhua*) untersucht werden.

Dazu wurden die Aktivitäten des Elektronen-Transport-Systems und der Cytochrom c-Oxidase im weißen Muskel und in der Leber von drei Kabeljaupopulationen gemessen, die bei verschiedenen Temperaturen „akklimiert“ wurden. Die Tiere stammen aus unterschiedlichen Breitengraden wobei sie, abhängig von ihrem Lebensraum, bei eher konstanten oder variablen Temperaturen leben (siehe Einleitung). Dabei könnten die Populationen aus den Gewässern der Nord-Ost-Arktis und dem Gebiet vor der norwegischen Küste Charakteristika stenothermer Tiere aufweisen, während die Tiere, die in der Nordsee beheimatet, sind obligatorisch eurytherme Eigenschaften aufweisen müssen.

2.1 ETS-Methode

Um den Temperatureinfluß auf mitochondriale Enzyme beim Kabeljau zu untersuchen wurde die Methode zur Messung des Elektronen-Transport-Systems weiter entwickelt und deren Eignung für die Abschätzung der aeroben Kapazitäten in gefrorenen Geweben zu überprüfen. Bei der Anpassung der ETS-Methode für die Messung an Muskel- und Leberproben des Kabeljaus wurden zum Teil große Veränderungen an der klassischen Version nach Owens und King (1975) vorgenommen, insbesondere die Konzentration des Indikators INT wurde deutlich erhöht. Im Vergleich zu früheren Untersuchungen an Fischen (Smith und Chong, 1982; Ikeda, 1989 und 1996) waren die in dieser Arbeit bestimmten Aktivitäten nach einer Temperaturkorrektur mit einem mittleren Q_{10} -Wert von 2, mehrfach höher. So lagen die von Smith und Chong (1982) ermittelten ETS-Aktivitäten in der Leber des Plattfisches *Hippoglossoides platessoides* mit $0,880 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ (25°C) um den Faktor 4 niedriger als die in der Leber des bei 8°C „akklimierten“ Nordseekabeljaus ($3,6 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$, extrapoliert für 25°C). Die Aktivitätsunterschiede könnten dabei zum Teil darauf zurückgeführt werden, daß Plattfische im Vergleich zum Kabeljau ein inaktiveres Verhalten zeigen. Die Ergebnisse von Ikeda (1989 und 1996) für nur wenige mm große Fische des Mikronekton waren mit ETS-Aktivitäten für die Ganztiere von $0,334 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$

(12°C) bzw. 0,272 bis 0,374 $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ (24 bis 27°C) um den Faktor 2 bis 7 gegenüber den Werten des weißen Muskels des bei 8°C gehälterten Nordseekabeljaus von 0,683 $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ (12°C) bzw. 1,8 $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ (geschätzt für 25°C) erniedrigt. Dabei kommt hinzu, daß die ETS-Aktivitäten für das Ganztier vermutlich höher liegen als die im eher anaeroben Gewebe des weißen Muskels.

Um zu überprüfen, ob die Messung des ETS zu vergleichbaren Ergebnissen führt wie die anderer oxidativer Enzyme, wurden vergleichende Messungen der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität durchgeführt. Dabei zeigten die beiden Enzyme im allgemeinen gleichgerichtete Veränderungen, die sich auch bei den CS-Aktivitäten, die an dem gleichen Ausgangsmaterial gemessen wurden (Serendero-Krause, 2000; A. Schmidt, pers. Mitteilung), wiederfanden (Abb. 3.7 und 3.8). Zudem konnte eine hoch-signifikante Korrelation der COX- ($p = 0,0001$) und der CS-Aktivitäten ($p \leq 0,001$) zu den Aktivitäten des ETS festgestellt werden (Abb. 3.9). Bei den thermischen Eigenschaften der Enzyme konnte beim ETS im Gegensatz zur COX ein deutlich größerer Einfluß der Lebensraum- und Akklimations Temperaturen festgestellt werden (siehe Abschnitt 4.3). Dies deutet darauf hin, daß hier die Regulation der Atmungskette erfolgt, da bei der Anpassung an veränderte Umweltbedingungen in erster Linie die regulatorischen Enzyme betroffen sind (Clarke, 1998). Wie von Chance und Williams (1956) nachgewiesen wurde, ist der Komplex I, der die einleitende Oxidation von NADH katalysiert, an der Regulation der Atmungskette beteiligt.

Wie schon bei früheren Untersuchungen des ETS beobachtet werden konnte (Owens und King, 1975; Packard, 1985; Cammen et al., 1990; u. a.) zeigte die ETS-Aktivität eine hoch-signifikante lineare Korrelation ($p = 0,0001$) zu den Sauerstoffverbrauchsrate (MO_2) der Ganztiere. Dazu wurden die ETS-Aktivitäten im weißen Muskel von Nordseekabeljau, der bei 4, 12 und 15°C „akklimiert“ wurde gegen dessen MO_2 -Daten für den Ruhestoffwechsel (T. Fischer, pers. Mitteilung) aufgetragen (Abb. 4.1). Gleiches erfolgte auch für die COX und die CS, bei denen sich ebenso signifikante lineare Korrelationen feststellen ließen ($p = 0,0001$ für COX und $p = 0,0006$ für CS).

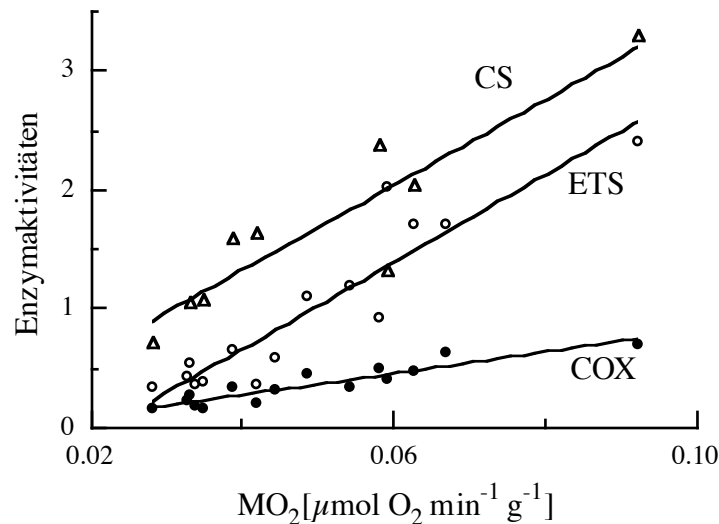


Abb. 4.1: Korrelation des Enzymaktivitäten im weißen Muskel zum Ruhesauerstoffverbrauch beim Kabeljau. (MW, n = 8-15; Erklärung im Text. Gleichungen der Regressionsgeraden:

$$\begin{aligned} \text{ETS}_A &= 36,534 \text{ MO}_2 - 0,801; p = 0,0001, r = 0,925 \\ \text{COX}_A &= 9,080 \text{ MO}_2 - 0,088; p = 0,0001, r = 0,938 \\ \text{CS}_A &= 35,698 \text{ MO}_2 - 0,102; p = 0,0006, r = 0,913 \end{aligned}$$

Die signifikante Korrelation der ETS-Aktivitäten zu denen anderer oxidativer Enzyme zeigt, daß sich diese Methode ebenso gut zur Detektion von Veränderungen der aeroben Kapazität eignet wie diese etablierten Methoden. Auch die lineare Korrelation zum Ruhesauerstoffverbrauch der Ganztiere war bei allen Enzymen ähnlich stark, sie unterscheiden sich also nicht in ihrer quantitativen Einsetzbarkeit. Ein Vorteil des ETS im Vergleich zur COX und der CS war aber die größere Sensibilität der Enzymeigenschaften gegenüber dem Einfluß der Adaptation und Akklimation, was es ermöglicht zu diesem Punkt detailliertere Aussagen zu machen.

Ein Nachteil der ETS-Messung gegenüber den anderen enzymatischen Tests war die mangelnde Stabilität der Enzymkomplexe im Extrakt. Da die Proben sofort der Messung zugeführt werden müssen, wird die Eignung der Methode zur Untersuchung großer Stichprobenzahlen eingeschränkt. Es sollten daher weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um den Extrakt zu stabilisieren. Dies kann möglicherweise durch eine separate Veränderung des pH-Wertes des Homogenisationspuffers bei einem gleichbleibend hohen Wert im Assaypuffer, ähnlich wie bei der COX-Messung, erreicht werden ohne die gemessenen Aktivitäten zu vermindern.

2.2 Einfluß der Temperatur auf die aerobe Kapazität

Weißer Muskel

Die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase im weißen Muskel von *G. morhua* wurde bereits in früheren Arbeiten bestimmt. Pelletier et al. (1993) ermittelten bei einer Meßtemperatur von 10°C für atlantische Dorsche, die bei 4°C „akklimiert“ wurden, Werte zwischen 0,42 $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ für Wintertiere und 0,25 $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ für Sommertiere. Die in dieser Arbeit bei 8°C gemessenen Werte für die entsprechende Akklimations-temperatur lagen mit $0,390 \pm 0,099 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ für den norwegischen (Wintertiere, siehe Material und Methoden) und $0,304 \pm 0,069 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ für den Nordseekabeljau (Sommertiere) in einem ähnlichen Bereich.

Bei der Auswertung des Akklimations-effekts im weißen Muskel (Abb. 3.10 und 3.12) konnten zwar keine durchgängigen signifikanten Unterschiede bei den verschiedenen Populationen oder den beiden Enzyme gefunden werden, es ließen sich aber im allgemeinen ähnliche Trends beobachten. Als Gesamtbild zeigte sich bei allen drei Populationen sowohl beim ETS als auch bei der COX in Abhängigkeit von der Hälterungstemperatur ein Trend zu höheren Aktivitäten bei den kalt-“akklimierten“ gegenüber den warm-“akklimierten“ Tieren. Bei der arktischen Population ist auf Grund der fehlenden 4°C-Hälterung der Trend weniger eindeutig.

Ein Maß für die Größenordnung der Temperaturkompensation bei der Akklimation ist der Faktor, um den die Enzymaktivitäten bei einer Zunahme der Hälterungstemperatur um 10°C abnehmen (EQ_{-10} nach Nathanailides, 1996). Dieser lag im weißen Muskel beim Nord-Ost-Arktischen Kabeljau für das ETS bei $1,34 \pm 0,24$ und für die COX bei $1,39 \pm 0,16$. Der Norwegische Küstenkabeljau zeigte eine etwas geringere Temperaturkompensation mit einem Faktor von $1,22 \pm 0,14$ für das ETS und $1,27 \pm 0,18$ für die COX, während der Nordseekabeljau mit Werten von $1,35 \pm 0,28$ (ETS) und $1,57 \pm 0,22$ (COX) wieder einen größeren Akklimationseffekt erkennen ließ. Die Temperaturkompensation unterscheidet sich bei den drei Populationen nicht signifikant. Ein ähnliches Ausmaß der Kompensation stellten auch Foster et al. (1993) für die COX im weißen Muskel von juvenilem Kabeljau fest. Hier lag die Aktivität bei der 15°C-Hälterung um den Faktor 1,3 niedriger als bei den bei 4°C „akklimierten“ Tieren. Dagegen konnte Pelletier et al. (1993) ebenfalls für die COX im weißen Muskel von *G. morhua* bei Akklimationstemperaturen zwischen 4 und 13°C bei Fischen, die entsprechend den Versuchstieren dieser Arbeit im Winter und im Spätsommer akklimatisiert wurden, annähernd keine oder sogar eine negative Kompensation beobachten.

Bei der Arbeit von Pelletier et al. kann aber ein Einfluß der Fütterungsbedingungen nicht ausgeschlossen werden, da verschiedene Futterrationen anboten wurden, um ein möglichst breites Spektrum der Wachstumsraten zu erhalten. Dagegen wurden die hier untersuchten Tiere *ad libitum* gefüttert. Wie für die COX von Goolish und Adelman (1987) am weißen Muskel des Forellenbarsch *Micropterus salmoides* und von Guderley et al. (1996) am Gastrointestinaltrakt des Kabeljaus nachgewiesen wurde, können niedrige Futterrationen zu einer Verminderung der Enzymaktivitäten führen. Ein weiterer Vergleich mit Ergebnissen der Temperaturkompensation für die COX im weißen Muskel anderer aktiver eurythermer Fischarten bestätigt die hier ermittelten Werte für den Kabeljau. Battersby und Moyes (1998) bestimmten für die Regenbogenforelle zwischen 4 und 18°C einen EQ_{10} um 1,5 und Sidell (1980) konnte für den Goldfisch *Carssius auratus* im Temperaturbereich von 5 bis 25°C einen Wert von 1,24 ermitteln.

Die Q_{10} -Werten bei der niedrigsten Hälterungstemperatur lagen für das ETS bei 2,2 für die arktischen (8°C), 1,8 für die norwegischen (4°C) und 2,7 für die Nordseetiere (4°C). Bei der COX schwankten sie um 2,3 (siehe Abschnitt 4.3). Im Vergleich dazu war die Kompensation der Hälterungstemperatur deutlich geringer. Das Ausmaß der Aktivitätsänderungen beim ETS und der COX mit der Akklimationstemperatur (1,22 bis 1,57) reicht also nicht aus um den Q_{10} vollständig zu kompensieren. Man kann daher im weißen Muskel von *G. morhua* für die beiden Atmungskettenenzyme nur von einer partiellen Temperaturkompensation sprechen (Precht, 1958).

Neben den Enzymen der mitochondrialen Atmungskette wurde am weißen Muskel der Dorsche aus den Wachstumsexperimenten von Serendero-Krause (2000) und A. Schmidt (pers. Mitteilung) auch die Aktivität der Citrat-Synthase (CS) gemessen. Wie beim ETS und der COX konnte dabei eine Kompensation der Hälterungstemperatur festgestellt werden. Mit einer Abnahme der Aktivitäten um den Faktor 2,5 für die arktische und 2,3 für die borealen Kabeljaupopulationen, bei Zunahme der Hälterungstemperatur um 10°C, zeigte sich bei der CS ebenfalls keine Abhängigkeit der EQ_{10} -Werte vom Lebensraum. Die von Serendero-Krause (2000) bestimmten Q_{10} -Werte für die CS lagen zwischen 1,5 und 2,0. Man kann hier also eine Überkompensation des Akklimationseffekts beobachten. Im Vergleich zu den Enzymen der Atmungskette war die Kompensation bei der CS also deutlich größer (Abb. 3.7). Dies zeigte sich auch schon bei früheren Arbeiten am weißen Muskel der Forelle (Guderley und Gawlicka, 1992) und des Kabeljaus (Pelletier et al., 1993). Ein Grund dafür könnte sein, daß im Gegensatz zur CS, die in der mitochondrialen Matrix gelöst vorliegt, die membrangebunden Enzyme der Atmungskette durch die Veränderung der

Lipidzusammensetzung der Membran im Verlauf der Akklimation beeinflusst werden können (Clarke, 1983; Wodtke 1976 und 1981). Des weiteren ist die Citrat-Synthase als Schlüsselenzym des Citrat-Cyclus stärker mit anderen Stoffwechselwegen vernetzt als die Atmungskette. So werden aus dem Citrat-Cyclus unter anderem Metabolite für die Aminosäure-Synthese abgezogen, die für das Wachstum von Geweben unerlässlich ist. Im weißen Muskel, der einen großen Anteil an der Gewichtszunahme der Tiere hat ist dieser Faktor sicherlich von Bedeutung.

Beim Vergleich der CS-Aktivitäten im latitudinalen Gradienten konnte keine eindeutige Abhängigkeit von der Population festgestellt werden. Das gleiche gilt auch für die ETS-Aktivitäten (Abb. 3.8). Dagegen konnte bei der COX ein Trend zu erhöhten Aktivitäten bei der arktischen Population beobachtet werden, wobei die Werte maximal um den Faktor 1,4 höher lagen als beim Nordseekabeljau (Abb. 3.13). Auch für den Ruhesauerstoffverbrauch des Kabeljaus ließen sich höhere Werte bei polaren gegenüber borealen Tieren feststellen. Bei Hälterungstemperaturen von 4 und 12°C zeigte der Nord-Ost-Arktische Kabeljau dabei um den Faktor 2 – 3 höhere Verbrauchsraten als der Nordseekabeljau (T. Fischer, pers. Mitteilung).

Das Ausmaß der Kompensation des Hälterungstemperatur war, auf Basis der aeroben Kapazität im weißen Muskel, bei allen drei Populationen nahezu identisch. Die arktischen und norwegischen Tiere, die in ihrem Lebensraum relativ geringen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind, zeigen auf dem Niveau der aeroben Kapazität wie der Kabeljau aus der Nordsee Eigenschaften eurythermer Organismen. Eine Erhöhung der aeroben Kapazitäten bei der polaren im Vergleich zu den borealen Populationen konnte nur tendenziell bei der COX-Aktivität beobachtet werden. Bezieht man die Ergebnisse des Ruhesauerstoffverbrauchs in die Überlegungen mit ein, kann man jedoch von einer Erhöhung der Stoffwechselraten bei den polaren Tieren ausgehen.

Leber

Neben dem eher anaeroben Gewebe des weißen Muskels wurden vergleichende Messungen an der Leber durchgeführt. Die ETS-Aktivität lag in der Leber um den Faktor 1,2 bis 2,1 höher als die Werte im weißen Muskel der entsprechenden Tiere. Dagegen war die Aktivität der COX in der Leber nicht bis 1,5 mal höher als die im Muskel. Der geringere Unterschied zwischen den Geweben bei der COX kann mit der unterschiedlichen Behandlung der beiden Gewebe erklärt werden. Im Gegensatz zu den Muskelproben wurden die Leberproben zentrifugiert, um den Fettanteil abzutrennen, wodurch vermutlich ein Teil der Aktivität

verloren ging. Beim ETS wurden dagegen beide Gewebeproben nahezu identisch behandelt, die Differenz der ETS-Aktivität entspricht also wahrscheinlich eher dem Unterschied in der oxidativen Kapazität der beiden Gewebe als die der COX. Im Vergleich zum Unterschied in der Mitochondriendichte, die in der Leber mit etwa 20% des Zellvolumens 3 bis 10 mal höher liegt als im weißen Muskel von Fischen mit ungefähr 2 bis 6% (Johnston, 1982; Egginton und Sidell, 1989), erscheint der Unterschied bei den Enzymaktivitäten recht niedrig. Dabei muß in Betracht gezogen werden, daß die Leber des Kabeljaus im Gegensatz zum Muskel einen hohen Fettanteil besitzt, in dem sich keine Mitochondrien befinden. Da die Aktivitäten für beide Gewebe jedoch auf g Frischgewicht bezogen wurden ist der ermittelte Unterschied wahrscheinlich deutlich unterschätzt.

In Abhängigkeit von der Akklimationstemperatur (Abb. 3.14 und 3.16) zeigte sich in der Leber bei den Aktivitäten beider Enzyme ein sehr einheitliches Bild, nicht aber für die verschiedenen Populationen. Bei den arktischen und norwegischen Tieren ließ sich eine Zunahme der Enzymaktivitäten mit steigender Hälterungstemperatur beobachten, während sich bei den Tieren aus der Nordsee, wie im weißen Muskel, eine Abnahme der Aktivitäten zeigte. Das gleiche Bild fand sich auch bei den Aktivitäten der Citrat-Synthase in der Leber von Kabeljau wieder die an den gleichen Proben gemessen wurden (A. Schmidt, pers. Mitteilung).

Diese Beobachtungen lassen sich zumindest teilweise mit der engen Beziehung der ETS- und COX-Aktivitäten zum Hepatosomatischen Index (HSI) erklären (Abb. 3.15 und 3.17), mit dem sie linear korreliert sind, wobei die Enzymaktivitäten mit steigendem HSI abnehmen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß unter günstigen Wachstumsbedingungen beim Kabeljau in der Leber Lipide akkumuliert werden, was zu einem Anstieg des HSI führt, wobei der relative Fettgehalt zunimmt, während der relative Proteingehalt der Leber recht konstant bleibt (Eliassen und Vahl, 1982; Holdway und Beamish, 1984; Pelletier et al., 1994). Eine Berechnung der Enzymaktivitäten der Gesamtleber, durch Multiplikation der Aktivitäten mit dem HSI, kann den Einfluß des variablen Lipidanteils weitgehend eliminieren. Wie in Abb. 4.2 gezeigt ist, relativiert sich dabei der Trend zur Zunahme der Aktivitäten bei der arktischen (NEAC) und der norwegischen Population (NCC) bei allen drei Enzymen (ETS, COX und CS) und es kann keine Abhängigkeit von der Hälterungstemperatur mehr beobachtet werden. Beim Nordseekabeljau (NC) bleibt dagegen ein leichter Trend zur Abnahme der Enzymaktivitäten erhalten.

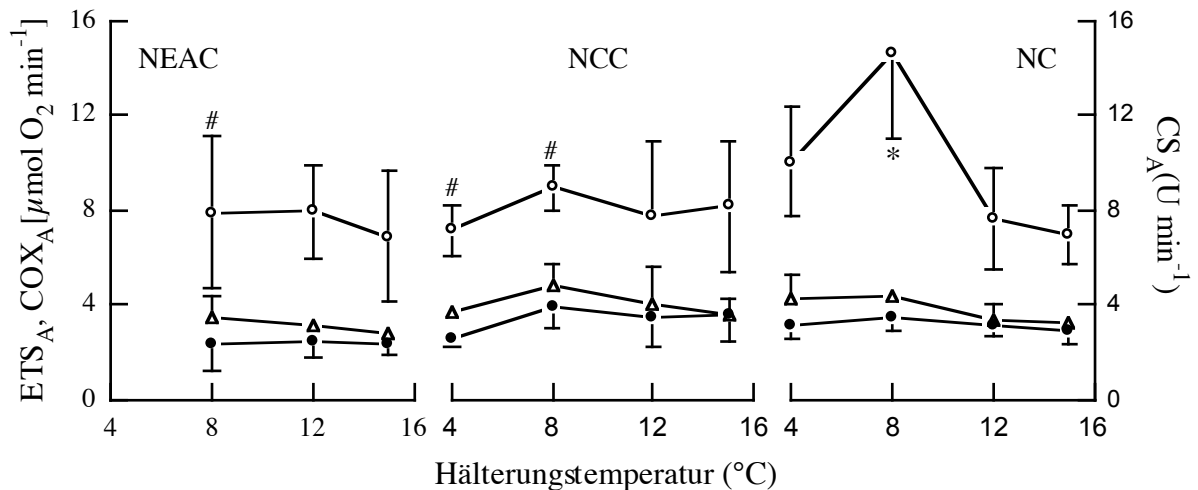


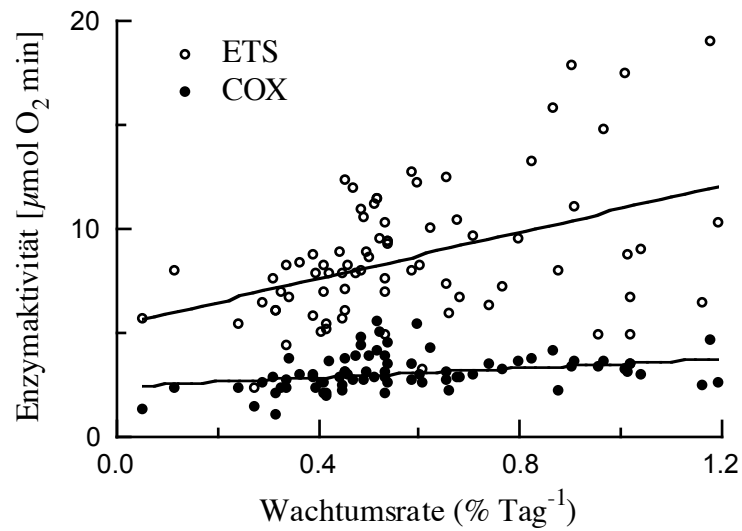
Abb. 4.2: Aktivitäten des ETS, der COX und der CS in der Gesamtleber von drei Kabeljaupopulationen in Abhängigkeit von der Hälterungstemperatur. (MW \pm SD, *signifikanter Unterschied zu den übrigen Hälterungstemperaturen, #signifikanter Unterschied zu NC, ANOVA, Post-Hoc, $n = 3-8$; ○ ETS, ● COX, □ CS)

Ein ähnliches Bild wie beim Kabeljau fand sich auch in der Leber von Goldfischen, die bei 5 und 25°C „akklimiert“ waren und bei denen keine signifikanten Unterschiede bei den COX-Aktivitäten pro mg Leberprotein festgestellt werden konnten (Caldwell, 1969). Ebenso war die Temperaturkompensation bei der Nordsee-Aalmutter bei Hälterungstemperaturen von 0 und 18°C für die COX in der Leber nur gering (Hardewig et al., 1999a). Ein Grund für die fehlende Kompensation der Akklimationstemperatur könnte eventuell das Einsetzen von zusätzlichen energieverbrauchenden Prozessen in der Leber bei Temperaturen oberhalb denen des Lebensraumes sein. Dies wäre beim NEAC und dem NCC bereits bei der 8°C-Hälterung der Fall. Dafür käme z. B. der Abbau von Porphyrin aus dem Hämoglobin abgestorbener Erythrocyten in Frage, die bei höheren Temperaturen eventuell vermehrt auftreten. Beim Nordseekabeljau, der auch in der Leber eine Temperaturkompensation zeigte, ist dies anscheinend weniger von Bedeutung, was auf einen höheren Grad der Eurythermie dieser Tiere, gegenüber der nominell stenothermen arktischen und norwegischen Population zurückzuführen sein kann.

2.3 Einfluß weiterer ökologischer Faktoren

Neben der Temperatur sind für die Aktivitäten oxidativer Enzyme noch weitere ökologische Faktoren von mehr oder weniger großer Bedeutung. Die meisten dieser Faktoren konnten durch die nahezu identischen Bedingungen bei den Wachstumsversuchen und die Auswahl der Proben eliminiert werden. Ein Einfluß der Jahreszeit auf die Enzymaktivitäten (Pelletier et al., 1993) konnte dagegen nicht ausgeschlossen werden, da die Versuche mit dem Nordseekabeljau September beendet wurden, während die arktischen und die norwegischen Tiere im Frühjahr geschlachtet wurden. Es handelte sich bei den Versuchstieren jedoch um Labortiere, die noch nicht Geschlechtsreif waren, der Einfluß der Jahreszeit auf die Enzymaktivitäten ist daher eher gering einzuschätzen. Die größten Unterschiede bei den Versuchstieren zeigten sich bei den Wachstumsraten. Diese war sowohl abhängig von der Akklimationstemperatur als auch von der Population (Pörtner et al., 2001). Es konnte aber keine Korrelation zwischen den Aktivitäten des ETS oder der COX im weißen Muskel und der Wachstumsrate festgestellt werden ($p > 0,1$), obwohl beide Enzyme eine deutliche Kompensation der Temperatur zeigten. Bestätigt werden diese Beobachtungen durch CS-Aktivitäten im weißen Muskel der Versuchstiere (Serendero-Krause, 2000), bei der ebenfalls kein Einfluß der Wachstumsrate nachgewiesen werden konnte. Auch in früheren Arbeiten an *G. morhua* (Pelletier et al., 1993, 1995) konnte keine Korrelation zwischen der Aktivität der COX im weißen Muskel und positiven Wachstumsraten festgestellt werden. Dagegen zeigte sich bei Tieren die an Gewicht verloren ein Anstieg der COX-Aktivität mit der Wachstumsrate (Pelletier et al., 1994). Solche negativen Wachstumsraten traten bei den Versuchstieren nicht auf, zu diesem Effekt können daher keine Aussagen gemacht werden. Im Gegensatz zum Muskel konnte für die ETS- und COX-Aktivitäten in der Leber pro g Frischgewicht eine signifikante negative Korrelation ($p = 0,0001$) mit der Wachstumsrate ermittelt werden. Dabei macht sich wieder der Einfluß des HSI bemerkbar, der durch die Akkumulation von Lipiden in der Leber mit zunehmenden Wachstumsraten ansteigt, während die Enzymaktivitäten mit steigendem HSI fallen (Abb. 3.15 und 3.17). Wie Pelletier et al. (1993) feststellten relativierte sich die Korrelation der COX-Aktivität zur Wachstumsrate, wenn die Aktivitäten auf die Menge der DNA an Stelle des Frischgewichts bezogen wurde. Bei der Korrektur der ETS- und COX-Aktivitäten mit dem HSI zeigte sich bei beiden Enzymen weiterhin eine signifikante lineare Korrelation ($p \leq 0,005$) mit einem Anstieg der Aktivitäten mit der Wachstumsrate (Abb. 4.3). Die niedrigen Korrelationskoeffizienten ($r \leq$

0,417) weisen aber darauf hin, daß der Einfluß des Wachstums auf die Enzymaktivitäten in der



Leber eher gering (< 20%) einzuschätzen ist.

Abb. 4.3: Korrelation der ETS- und COX-Aktivitäten in der Gesamtleber zur Wachstumsrate(wr) beim Kabeljau. (MW, n = 77; Gleichungen der Regressionsgeraden:

$$\text{ETS}_A = 5,597 \text{ wr} + 5,355 ; p = 0,0001, r = 0,417$$

$$\text{COX}_A = 1,102 \text{ wr} + 2,404; p = 0,0050, r = 0,317)$$

2.4 Eigenschaften mitochondrialer Enzyme

Neben den Kapazitäten der oxidativen Enzyme war auch der Einfluß der Akklimation und der Adaptation auf die thermische Empfindlichkeit des ETS und der COX von Interesse. Dazu wurden im weißen Muskel jeweils die Q_{10} -Werte und die Arrhenius-Aktivierungsenergien (E_a) für die beiden Enzyme bestimmt.

Elektronen-Transport-System

Bei den Q_{10} -Werte und Aktivierungsenergien für das ETS zeigte sich zunächst, daß diese nicht über den gesamten Meßtemperaturbereich konstant waren. Dabei lagen die Werte im unteren Meßtemperaturbereich mit 1,3 bis 2,7 für die Q_{10} -Werte ($2 - 8^\circ\text{C}$) und 16,6 bis 44,0 kJ mol^{-1} für die E_a -Werte um den Faktor 1,5 bis 7,5 niedriger als die im oberen Temperaturbereich mit 3,5 bis 10,0 für den Q_{10} ($12 - 18^\circ\text{C}$) und 94,0 bis 120,0 kJ mol^{-1} für die Aktivierungsenergien. Beim Q_{10} zeigte sich dabei, daß die Werte im oberen Temperaturabschnitt weit außerhalb des üblichen Bereichs von 2 – 3 für physiologische Prozesse lagen. Bei der Arrhenius-Analyse für das ETS (Abb. 3.18a und b) konnten bei den borealen Populationen fast durchgängig Arrhenius-Break-Temperaturen (ABT) festgestellt werden, die im Bereich zwischen 6 und 11°C lagen. Der Anstieg der Aktivierungsenergien oberhalb der ABT widerspricht der allgemeinen Beobachtung, daß bei physiologischen Prozessen die Q_{10} - und E_a -Werte unterhalb der ABT größer sind als oberhalb (Prosser, 1991). Dies wird im allgemeinen auf eine Inaktivierung bzw. Denaturierung von Enzymen zurückgeführt. Dabei muss jedoch erwähnt werden, daß die in der Literatur beschriebenen ABT meist weit über der oberen kritischen Temperatur (T_c) der untersuchten Tiere lagen. Diese Grenze, die durch das Einsetzen der Anaerobiose charakterisiert wird, liegt beim Nordseekabeljau oberhalb von 19°C (Serendero-Krause, 2000). Da die hier verwendeten Meßtemperaturen mit 2 bis 18°C noch unter dieser Schwelle lagen, handelt es sich bei den beobachteten Diskontinuitäten in den Arrhenius-Darstellungen vermutlich nicht um ABT, wie sie üblicherweise definiert sind. Dies verdeutlicht ein Vergleich mit den Untersuchungen von Pörtner et al. (1999) an der antarktischen Muschel *Laternula elliptica*, die eine obere T_c zwischen 3 und 6°C besitzt. Für die mitochondriale state III Respiration wurde hier eine ABT bei 9°C ermittelt, oberhalb der der Q_{10} -Wert stark abfiel. Unterhalb der ABT zeigte sich jedoch eine weitere Diskontinuität bei den Q_{10} -Werten, die zwischen 0 und 3°C geringer waren als zwischen $4,5$ und 9°C . Die ABT, die beim Kabeljau ermittelt wurde, entspricht wahrscheinlich diesem zweiten Bruch und kann als Schwellentemperatur interpretiert werden,

oberhalb der die Temperaturempfindlichkeit der Enzyme, erkennbar an den Q_{10} -Werten, stark zunimmt und gleichzeitig die Katalyse durch hohe Aktivierungsenergien gebremst wird.

Für den arktischen Kabeljau konnten im Gegensatz zu den borealen Populationen, keine ABT ermittelt werden. Die Q_{10} -Werte und Aktivierungsenergien zeigten hier keine Anpassung an die Akklimationstemperatur und lagen Werten um 2,2 (Q_{10}) bzw. 80 kJ mol⁻¹ (E_a) auf einem vergleichsweise hohem Niveau (Abb 3.19).

Beim norwegischen Kabeljau konnten bei den unteren Hälterungstemperaturen (4 bis 12°C) jeweils ABT ermittelt werden, die zwischen 6 und 10°C lagen (Abb. 3.18a). In der natürlichen Umgebung der Tiere, in der sie relativ homogene Temperaturen bis 4,5°C vorfinden, wirkt sich die Erhöhung der Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte oberhalb der Schwellentemperatur jedoch nicht aus. Eine Verschiebung der ABT mit der Hälterungstemperatur konnte bei der norwegischen Population nicht beobachtet werden und auch die Q_{10} - und E_a -Werte zeigten keine Temperaturanpassung (Abb. 3.19). Sie lagen mit Werten um 1,5 (Q_{10}) und 30 kJ mol⁻¹ (E_a) auf einem konstant niedrigen Niveau. Für die 15°C-Hälterung konnte dagegen keine ABT mehr ermittelt werden und der Q_{10} -Werte lag mit 2,3 ebenso wie die Aktivierungsenergie mit über 90 kJ mol⁻¹ signifikant höher als die Werte bei den übrigen Akklimationstemperaturen.

Beim Nordseekabeljau, der in seinem Habitat stärkeren Temperaturschwankungen ausgesetzt ist, traten die Diskontinuitäten bei der Arrhenius-Darstellung am deutlichsten hervor (Abb. 3.18b). Die Schwellentemperaturen lag mit 8 bis 11°C etwa im Bereich der maximal tolerierten Habitatterperaturen. Die Erhöhung der Temperaturempfindlichkeit und der Aktivierungsenergie der Enzyme oberhalb davon könnte eine Erklärung dafür sein, wieso die Tiere bei Temperaturen über 10°C in kältere Gewässer abwandern. Zudem konnte eine leichte Verschiebung mit der Hälterungstemperatur beobachtet werden, die auf die Möglichkeit einer saisonalen Anpassung der Schwellentemperatur hindeutet. Auch beim Vergleich der Q_{10} - und E_a -Werte für die Nordseetiere (Abb. 3.20) zeigte sich eine Anpassung an die Akklimationstemperatur. Diese waren bei der 15°C-Hälterung mit 1,3 (Q_{10}) bzw. 35 kJ mol⁻¹ (E_a) etwa um die Hälfte niedriger als bei 4°C mit 2,7 bzw. 60 kJ mol⁻¹. Hohe Aktivierungsenergien führen zu einer zusätzlichen Verminderung der Aktivität der einzelnen Enzymmoleküle. Nach Pörtner et al. (2000) ist es für die Regulation des Stoffwechsels bei niedrigen Temperaturen jedoch von Vorteil, mit einer größeren Zahl von Enzymen mit geringeren Aktivitäten zu arbeiten.

Der gleiche Effekt macht sich auch im latitudinalen Gradienten bemerkbar. Hier zeigte die arktische Population, läßt man den bei 15°C gehälterten Norwegischen Kabeljau außen

vor, signifikant höhere Aktivierungsenergien als die borealen Vertreter, was als eine Anpassung an ihren polaren Lebensraum gewertet werden kann. Aufgrund der homogenen Umgebungstemperaturen wirkt sich hier die Zunahme der Temperatursensitivität der Enzyme, die mit der Erhöhung der Aktivierungsenergie einhergeht, weniger stark aus. Daher können polare Tiere diesen Mechanismus sehr viel besser ausnutzen.

Cytochrom c-Oxidase

Im Vergleich zum ETS lagen bei der COX die Q_{10} -Werte mit einem Mittelwert von 2,3 und Aktivierungsenergien mit durchschnittlich 55 kJ mol^{-1} in einer ähnlichen Größenordnung. Die Werte waren hier jedoch über den gesamten Meßtemperaturbereich ($2 - 8^\circ\text{C}$) konstant und es ließen sich kaum Unterschiede in Abhängigkeit von der Akklimationstemperatur oder dem Lebensraum feststellen. Dies zeigte sich auch schon bei Untersuchungen der Aalmutter (Hardewig et al. 1999a), bei der sich die Q_{10} -Werte für die COX von *P. brachycephalum* und *Z. viviparus* bei Hälterungstemperaturen von 0 und 18°C nur geringfügig unterschieden, und auch bei Karpfen, die bei 10 und 30°C „akklimiert“ wurden (Wodtke, 1981).

Im Vergleich zur COX zeigten die Eigenschaften des Elektronen-Transport-Systems eine größere Sensitivität gegenüber dem Einfluß der Umgebungstemperatur. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei der ETS-Messung die NADH-Dehydrogenase erfasst wird, die den Elektronenfluß der Atmungskette mitreguliert (Packard, 1985), da regulatorische Enzyme bei der Exposition an veränderte Umweltbedingungen als erstes angepasst werden (Clarke, 1998). Auf dieser Basis konnten bei den drei Kabeljaupopulationen Anpassungen an die Lebensraumbedingungen festgestellt werden. Der Nord-Ost-Arktische Kabeljau zeigte mit hohen Aktivierungsenergien und der fehlenden Möglichkeit zur Anpassung der Enzymeigenschaften Charakteristika kalt-angepasster, stenothermer Tiere. Die norwegische Küstenpopulation ließ ebenfalls keine eindeutige Anpassung der Enzymeigenschaften an die Hälterungstemperatur erkennen, was Eigenschaften stenothermer Organismen sind. Die geringe Temperaturempfindlichkeit und niedrigen Aktivierungsenergien der Enzyme im Bereich der Lebensraumtemperaturen entsprechen jedoch eher dem Bild bei eurythermen Tieren. Beim Nordseekabeljau ließen sich schließlich sowohl niedrige Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte, als auch eine Anpassung derselben an die Akklimationstemperatur beobachten. Wie aufgrund der relativ großen Schwankungen der Lebensraumtemperaturen anzunehmen war, zeigten die Tiere also eindeutig eurytherme Merkmale.

3 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Akklimation an verschiedene Hälterungstemperaturen auf das Elektronen-Transport-System (ETS) und die Cytochrom c-Oxidase (COX) im weißen Muskel und in der Leber in Abhängigkeit von der latitudinalen Verbreitung untersucht. Die Untersuchung erfolgte an drei Kabeljaupopulationen (*G. morhua*), die aufgrund homogener oder variabler Lebensraumtemperaturen Charakteristika stenothermer oder eurythermer Tiere aufweisen könnten. Dazu wurde zunächst die biochemisch-physiologische Anwendbarkeit der ETS-Methode überprüft.

Die ETS-Aktivitäten zeigten signifikante Korrelationen zu den Aktivitäten der COX und denen der Citrat-Synthase (CS) der gleichen Proben. Bei allen drei Enzymen konnte eine lineare Beziehung der Aktivität im weißen Muskel zum Ruhesauerstoffverbrauch beobachtet werden.

Im weißen Muskel ließ sich eine Kompensation der Hälterungstemperaturen feststellen. Die Unterschiede im latitudinalen Gradienten waren, in Bezug auf die aerobe Kapazität und das Ausmaß der Kompensation nur gering. Die Enzymaktivitäten in der Leber zeigten signifikante Korrelationen zum Hepatosomatischen Index und zur Wachstumsrate der Ganztiere. Ein eindeutiger Einfluß der Akklimations- oder der Lebensraumtemperaturen konnte nicht nachgewiesen werden. Die thermischen Eigenschaften der COX ließen keinen Einfluß der Umgebungstemperatur erkennen. Dagegen zeigten sich beim ETS deutliche Unterschiede im latitudinalen Gradienten. Bei den arktischen Tieren konnten Merkmale stenothermer und beim Nordseekabeljau eurythermer Organismen beobachtet werden. Beim Norwegischen Küstenkabeljau zeigte sich dagegen keine eindeutige Zuordnung der Eigenschaften des ETS.

Die Ergebnisse zeigen, daß die ETS-Methode ebenso wie andere oxidative Enzyme geeignet ist Veränderungen der aeroben Kapazität zu detektieren und die Grundstoffwechselraten abzuschätzen. Die größere Temperatursensitivität der Eigenschaften des ETS ermöglicht jedoch detailliertere Aussagen zum Einfluß der Akklimation und Adaptation. Die aerobe Kapazität in der Leber wird im Gegensatz zum Muskel nur relativ geringfügig von der Temperatur beeinflusst. Auf Basis der aeroben Kapazitäten im weißen Muskels zeigten alle drei Populationen eher eurytherme Merkmale und keine deutliche Abhängigkeit von der geographischen Verbreitung. Dagegen lassen die Ergebnisse für die thermischen Eigenschaften der Enzyme den Schluß zu, daß auf diesem Niveau die bereits Selektion stattfindet.

4 Literatur

- Arntz, W.E., Brey, T., Gallardo, V.A. (1994).** Antarctic Zoobenthos. *Oceanogr. Mar. Biol.: Ann. Rev.* 32, S. 241-304
- Battersby, B.J. and Moyes, C.D. (1998).** Influence of acclimation temperature on mitochondrial DNA, RNA, and enzymes in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 275, S. 905-912
- Brunori, M. and Wilson, T. (1982).** Cytochrome oxidase. *TIBS* 7 (8), S. 295-299
- Cai, Y.I. and Adelman, I.R. (1990).** Temperature acclimation in respiratory and cytochrome c oxidase activity in common carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.* 95 (1), S. 139-144
- Caldwell, R.S. (1969).** Thermal compensation of respiratory enzymes in tissues of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 31, S. 79-93
- Cammen, L.M., Corwin, S., Christensen, J.P. (1990).** Electron transport system (ETS) activity as a measure of benthic macrofaunal metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 65, S. 171-182
- Chance, B. und Williams, G.R. (1956).** The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. subj. Biochem.* 27, S. 65-134
- Clarke, A. (1987).** The adaptation of aquatic animals to low temperature. In: Grout, B.W.W. und Morris, G.J. (Hrsg.). *The effects of low temperature on biological systems*. Edward Arnold, London, S. 315-348
- Clarke, A. (1983).** Life in cold water: The physiological ecology of polar marine ectotherms. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 21, S. 341-453
- Clarke, A. and Johnston, N.M. (1999).** Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *J. Anim. Ecol.* 68, S. 893-905
- Clarke, A. (1993).** Seasonal acclimation and latitudinal compensation: do they exist? *Funct. Ecol.* 7, S. 139-149
- Clarke, A. (1998).** Temperature and energetics: an introduction to cold ocean physiology. In: Pörtner, H.O. und Playle, R.C. (Hrsg.). *Cold ocean physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, S. 3-30

- Cossins, A.R.** (1994). Homeoviscous adaptation of biological membranes and its functional significance. In: Cossins, A.R. (Hrsg.). Temperature adaptation of biological membranes. Portland Press, London, S. 63-76
- Crocket, E.L. und Sidell, B.D.** (1990). Some pathways in energy metabolism are cold adapted in antarctic fishes. *Physiol. Zool.* 63 (3), S. 472-488
- Dippner, J.W.** (1999). Retrospective studies on long term data series of climate conditions and population dynamics of cod and eelpout. Draft Report: Data Report, Climatology and Climate Variability
- Dunn, J.F.** (1988). Low-temperature adaptation of oxidative energy production in cold-water fishes. *Can. J. Zool.* 66, S. 1098-1104
- Eggington, S. and Sidell, B.D.** (1989). Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 145, S. 1-10
- Elderkin, C.L., Schneider, D.W., Stoeckel, J.A., Padilla, D.K.** (1998). A method for measuring in situ oxygen consumption rates of freshwater gastropods. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 17 (3), S. 338-347
- Eliassen, J.-E., Vahl, O.** (1982). Seasonal variations in biochemical composition and energy content of liver, gonad and muscle of mature and immature cod, *Gadus morhua* (L.) from Balsfjorden, Northern Norway. *J. Fish Biol.* 20, S. 707-716
- Engel, J.** (1997). Signifikante Schule der schlichten Statistik. Filander Verlag, Fürth
- Foster, A.R., Hall, S.J., Houlihan, D.F.** (1993). The effects of temperature acclimation on organ/tissue mass and cytochrome c oxidase activity in juvenile cod (*Gadus morhua*). *J. Fish Biol.* 42, S. 947-957
- Goolish, E.M. and Adelman, I.R.** (1987). Tissue-specific cytochrome oxidase activity in largemouth bass: The metabolic costs of feeding and growth. *Physiol. Zool.* 60 (4), S. 454-464
- G.-Toth, L., Szabo, M., Webb, D.J.** (1995). Adaptation of the tetrazolium reduction test for the measurement of the electron transport system (ETS) activity during embryonic development of mekade. *J. Fish. Biol.* 46, S. 835-844
- Guderley, H. und Johnston, I.A.** (1996). Pasticity of fish muscle mitochondria with thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* 199, S. 1311-1317

- Guderley, H., Dutil, J.-D., Pelletier, D. (1996).** The physiological status of Atlantic cod, *Gadus morhua*, in the wild and the laboratory: estimates of growth rates under field conditions. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, S. 550-557
- Guderley, H. and Gawlicka, A. (1992).** Qualitative modification of muscle metabolic organization with thermal acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* 10 (2), S. 123-132
- Guderley, H. (1998).** Temperature and growth rates as modulators of the metabolic capacities of fish muscle. In: Pörtner, H.O. und Playle, R.C. (Hrsg.). *Cold ocean physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, S. 58-87
- Hardewig, I., van Dijk, P.L.M., Moyes, C.D., Pörtner, H.O. (1999a).** Temperature-dependent expression of cytochrome-c oxidase in Antarctic and temperate fish. *Am. J. Physiol.* 277, S. 508-516
- Hardewig, I., Peck, L.S., Pörtner, H.O. (1999b).** Thermal sensitivity of mitochondrial function in the Antarctic Notothenoid *Lepidonotothen nudifrons*. *J. Comp. Physiol. B* 169, S. 597-604
- Hoffman, R.J. (1983).** Temperature modulation of the kinetic of phosphoglucose isomerase genetic variants from the sea anemone *Metridium senile*. *J. Exp. Zool.* 277, S. 361-370
- Holdway, D.A. and Beamish, F.W.H. (1984).** Specific growth rate and proximate body composition of atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 81, S. 147-170
- Holeton, G.F. (1974).** Metabolic cold adaptation of polar fish: Fact or artefact? *Physiol. Zool.* 47 (3), S. 137-152
- Holeton, G.F. (1973).** Respiration of arctic char (*Salvelinus alpinus*) from a high arctic lake. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 30, S. 717-723
- Ikeda, T. (1989).** Estimated Respiration Rate of Myctophid Fish from the Enzyme Activity of the Electron-transport-system. *J. Ocean. Soc. Jpn.* 45, S. 167-173
- Ikeda, T. (1996).** Metabolism, body composition, and energy budget of the mesopelagic fish *Maurolicus muelleri* in the sea of Japan. *Fish. Bull.* 94, S. 49-58
- Johnston, I.A., Guderley, H., Franklin, C.E., Crockford, T., Kamunde, C. (1994).** Are mitochondria subject to evolutionary temperature adaptation? *J. Exp. Biol.* 195, S. 293-306

- Johnston, I.A.** (1982). Capillarisation, oxygen diffusion distances and mitochondrial content of carp muscles following acclimation to summer and winter temperatures. *Cell. Tissue Res.* 222 (2), S. 325-337
- Johnston, I.A., Calvo, J., Guderley, H., Fernandez, D., Palmer, L.** (1998). Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacity of muscle mitochondria in perciform fishes. *J. Exp. Biol.* 201, S. 1-12
- Johnston, I.A., Clarke, A., Ward, P.** (1991). Temperature and metabolic rate in sedentary fish from the Antarctic, North Sea and Indo-West Pacific Ocean. *Mar. Biol.* 109, S. 191-195
- Kenner, R.A. und Ahmed, S.I.** (1975). Measurements of Electron Transport Activities in Marine Phytoplankton. *Mar. Biol.* 33, S. 119-127
- Lehninger, A.L. (Begr.)** (1998). *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Madon, S.P., Schneider, D.W., Stoeckel, J.A.** (1998). In situ estimation of zebra mussel metabolic rates using the electron transport system (ETS) assay. *J. Shellfish Res.* 17(1), S. 195-203
- Moyes, C.D., Mathieu-Costello, O.A., Tsuchiya, N., Filburn, C., Hansford, R.G.** (1997). Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *Am. J. Physiol.* 272, S. 1345-1354
- Muus, B.J.** (1991). *Meeresfische der Ostsee, der Nordsee und des Nordatlantiks*. BLV, München, Wien, Zürich
- Nathanailides, C.** (1996). Are changes in enzyme activities of fish muscle during cold acclimation significant. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, S. 2333-2336
- Nickerson, D.M., Facey, D.E., Grossman, G.D.** (1989). Estimating Physiological Threshold with Continuous Two-Phase Regression. *Physiol. Zool.* 62 (4), S. 866-887
- Noack, S.** (1980). *Statistische Auswertung von Meß- und Versuchsdaten mit Taschenrechner und Tischcomputer*. Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York
- Owens, T.G. and King, F.D.** (1975). The Measurement of Respiratory Electron-Transport-System Activity in Marine Zooplankton. *Mar. Biol.* 30, S. 27-36
- Packard, T.T. and Healy, M.L.** (1968). Electrochemical Standardization of the Dehydrogenase Assay used in the Estimation of Respiration Rates. *J. Mar. Res.* 26, S. 66-74

- Packard**, T.T. (1971). The Measurement of Respiratory Electron-transport Activity in Marine Phytoplankton. J. Mar. Res. 29 (3), S. 235-244
- Packard**, T.T. (1985). Oxygen Consumption in the Ocean: Measuring and Mapping with Enzyme Analysis. Adv. Chem. Ser. 209, S. 177-209
- Pelletier**, D., Guderley, H., Dutil, J.-D. (1993). Does aerobic capacity of fish muscle change with growth rates? Fish Physiol. Biochem. 12 (2), S. 83-93
- Pelletier**, D., Blier, P.U., Dutil, J.-D., Guderley, H. (1995). How should enzyme activities be used in fish growth studies? J. Exp. Biol. 198, S. 1493-1497
- Pelletier**, D., Dutil, J.-D., Blier, P., Guderley, H. (1994). Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. J. Comp. Physiol. 164, S. 179-190
- Pörtner**, H.O., Knust, R., Sartoris, F.J. (2001). Climate induced temperature effects on growth performance, fecundity and recruitment in marine fish: developing a hypothesis for cause and effect relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common eelpout (*Zoarces viviparus*). Near shore coast. Oceanogr., im press
- Pörtner**, H.O., van Dijk, P.L.M., Hardewig, I. Sommer, A. (2000). Levels of metabolic cold adaptation: tradeoffs in eurythermal and stenothermal ectotherms. In: Davison, W., Williams, C.H. (Hrsg.). Antarctic Ecosystems: models for wider ecological understanding. Caxton Press, Christchurch
- Pörtner**, H.O., Hardewig, I., Peck, L.S. (1999). Mitochondrial function and critical temperature in the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*. Comp. Biochem. Physiol. A 124, S. 179-189
- Precht**, H. (1958). Concepts of the temperature adaptation of unchanging reaction system of cold blooded animals. In: Prosser, C.L. (Hrsg.). Physiological adaptation. Am. Physiol. Soc., New York, S. 50-78
- Rafael**, J. (1983). Cytochrome c Oxidase. In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.). Methods of enzymatic analyses. Vol.III. VHC, New York, Weinheim, S. 266-273
- Saunders**, R.L. (1963). Respiration of the Atlantic Cod. J.Fish. Res. Bd. Can. 20 (2), S. 373-386
- Schalk**, P.H. (1988). Respiratory electron transport system (ETS) activities in zooplankton and micronekton of the Indo-Pacific region. Mar. Ecol. Prog. Ser. 44, S. 25-35

- Scholander**, P.F., Flagg, W., Walters, V., Irving, L. (1953). Climatic adaptation in arctic and tropical poikilotherms. *Physiol. Zool.* 26, S. 67-92
- Segel**, J.H. (1976). *Biochemical Calculations*. J. Wiley & Sons, New York
- Serendero-Krause**, I. (2000). Bedeutung der Umgebungstemperaturen für den aeroben Stoffwechsel von Kabeljau (*Gadus morhua*) aus Nordsee und Nord-Norwegischer See. Diplomarbeit, Universität Bremen
- Shaklee**, J.B., Christiansen, J.A., Sidell, B.D., Prosser, C.L., Whitt, G.S. (1977). Molecular aspects of temperature acclimation in fish: Contributions of changes in enzyme activities and isozyme patterns to metabolic reorganization in the green sunfish. *J. Exp. Zool.* 201, S. 1-20
- Sidell**, B.D. (1980). Responses of Goldfish (*Carassius auratus*, L.) muscle to acclimation temperature: Alterations in biochemistry and proportions of different fiber types. *Physiol. Zool.* 53, S. 98-107
- Smith**, J.C. and Chong, C.K. (1982). Body weight, Activities of Cytochrome Oxidase and Electron Transport System in the Liver of the American Plaice *Hippoglossoides platessoides*. Can these Activities Serve as Indicators of Metabolism? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 9, S. 171-179
- Sondergutachten Nordsee** (1980). Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen
- St-Pierre**, J., Charest, P.-M., Guderley, H. (1998). Relative contribution of quantitative and qualitative changes in mitochondria to metabolic compensation during seasonal acclimatisation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 201, S. 2961-2970
- Torres**, J.J. und Somero, G.N. (1988). Metabolic enzymic activities and cold adaptation in Antarctic mesopelagic fishes. *Mar. Biol.* 98, S. 169-180
- Wodtke**, E. (1976). Discontinuities in the Arrhenius Plots of mitochondrial membrane-bound enzyme systems from a poikilotherm: Acclimation temperature of carp affects transition temperatures. *J. Comp. Physiol.* 110, S. 145-157
- Wodtke**, E. (1981). Temperature adaptation of biological membranes. Compensation of the molar activity of cytochrome c oxidase in the mitochondrial energy-transducing membrane during thermal acclimation of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Biochim. Biophys. Acta* 640, S. 710-720
- Wohlschlag**, D.E. (1960). Metabolism of antarctic fish and the phenomenon of cold adaptation. *Ecology* 41, S. 287-292

Wollenberger, A.O., Ristau, O., Schoffa, G. (1960). Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. Pflüger Arch. 270, S. 399-412

5 Anhang

Tab. 7.1: ETS-Aktivität in Abhängigkeit von der Einwaage-Konzentration im Homogenat. (MW \pm SD, für Einwaagen $> 58,6$ mg FG/ml: MW \pm MA, n = 2-7)

Einwaage-Konzentration [mg FG/ml]	ETS-Aktivität [$\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]
111,1	0,160 \pm 0,017
79,3	0,368 \pm 0,088
58,6	0,233 \pm 0,017
20,2	0,550 \pm 0,064
14,8	0,461 \pm 0,300
11,6	1,051 \pm 0,117
10,1	1,206 \pm 0,067
5,0	1,238 \pm 0,038
2,0	1,159 \pm 0,154

Tab. 7.2: ETS-Aktivität in Abhängigkeit von der INT-Konzentration im Assay mit INT-Stammlösungen in Wasser und 0,1M Phosphatpuffer (MW \pm SD für INT in Phosphatpuffer, n = 3, MW \pm MA für INT in Wasser, n = 2, keine MA oder SD für INT-Konzentration = 2,67, n = 1)

INT-Konzentration [mM]	ETS-Aktivität [$\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$] 8 mM INT-Stammlösung in	
	Wasser	0,1 M Phosphatpuffer
0,17	0,189 \pm 0,000	0,189 \pm 0,000
0,33	0,377 \pm 0,000	0,377 \pm 0,000
0,67	0,472 \pm 0,133	0,587 \pm 0,158
1,00	0,572 \pm 0,189	0,794 \pm 0,139
1,33	0,749 \pm 0,011	1,019 \pm 0,068
1,67	1,044 \pm 0,257	1,302 \pm 0,068
2,00	0,906 \pm 0,299	1,205 \pm 0,221
2,33	1,189 \pm 0,000	1,358 \pm 0,080
2,67	0,868	1,603

Tab. 7.3: ETS-Aktivität in Abhängigkeit von der NADH-Konzentration im Assay. (n = 1)

NADH-Konzentration [mM]	ETS-Aktivität [$\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]
0,00	0,000
0,11	0,992
0,21	1,190
0,43	1,190
0,85	1,190
1,28	1,190
1,70	0,922
2,13	0,922

Tab. 7.4: ETS-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert im Homogenisations- und Assaypuffer. (MW \pm SD, n = 3)

pH-Wert im Puffer	ETS-Aktivität [$\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]
7,7	0,159 \pm 0,276
7,9	0,744 \pm 0,288
8,1	0,825 \pm 0,046
8,3	1,199 \pm 0,244
8,5	1,217 \pm 0,207

Tab 7.5: Haltbarkeit des ETS im Extrakt bei einer Lagerung auf Eis. (MW \pm MA, n = 2)

Zeit (h)	ETS-Aktivität [$\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]
0,0	1,289 \pm 0,044
0,5	1,195 \pm 0,089
1,0	1,038 \pm 0,133
1,5	0,755 \pm 0,000
2,0	0,975 \pm 0,044

Tab. 7.6: Haltbarkeit des ETS bei einer Lagerung der Gewebeproben bei -20°C . (MW \pm MA, n = 2)

Zeit (h)	ETS-Aktivität [$\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]
0	0,527 \pm 0,047
5	0,604 \pm 0,023
12	0,251 \pm 0,517
15	0,594 \pm 0,013
29	0,579 \pm 0,142
30	0,547 \pm 0,053

Tab. 7.7: ETS-Aktivitäten [$\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$] im weißen Muskel von Kabeljau bei verschiedenen Meßtemperaturen für die einzelnen Populationen und Akklimationstemperaturen. (MW \pm SD, n = 6-8)

Population	Meßtemperatur (°C)	Akklimationstemperatur (°C)			
		4	8	12	15
Nord-Ost-Arktischer Kabeljau (NEAC)	2		0,256 \pm 0,046	0,310 \pm 0,015	0,197 \pm 0,054
	5		0,313 \pm 0,094	0,363 \pm 0,062	0,253 \pm 0,043
	8		0,410 \pm 0,117	0,474 \pm 0,050	0,326 \pm 0,057
	12		0,725 \pm 0,247	0,933 \pm 0,153	0,524 \pm 0,110
	15		1,417 \pm 0,491	1,273 \pm 0,208	1,000 \pm 0,216
	18		1,271 \pm 0,204	1,792 \pm 0,347	1,311 \pm 0,295
Norwegischer Küstenkabeljau (NCC)	2	0,331 \pm 0,101	0,318 \pm 0,068	0,369 \pm 0,128	0,225 \pm 0,040
	5	0,375 \pm 0,097	0,400 \pm 0,103	0,373 \pm 0,111	0,277 \pm 0,075
	8	0,485 \pm 0,145	0,378 \pm 0,106	0,444 \pm 0,139	0,390 \pm 0,084
	12	0,858 \pm 0,253	0,958 \pm 0,378	0,628 \pm 0,154	0,642 \pm 0,148
	15	1,433 \pm 2,182	1,498 \pm 0,276	1,538 \pm 0,512	1,326 \pm 0,285
	18	2,182 \pm 0,380	2,438 \pm 0,589	2,121 \pm 0,469	1,949 \pm 0,476
Nordseekabeljau (NC)	2	0,314 \pm 0,063	0,337 \pm 0,110	0,306 \pm 0,086	0,310 \pm 0,065
	5	0,347 \pm 0,033	0,392 \pm 0,126	0,389 \pm 0,146	0,341 \pm 0,070
	8	0,585 \pm 0,057	0,513 \pm 0,190	0,420 \pm 0,102	0,357 \pm 0,053
	12	0,918 \pm 0,109	0,902 \pm 0,382	0,638 \pm 0,133	0,547 \pm 0,158
	15	1,695 \pm 0,403	1,556 \pm 0,857	1,103 \pm 0,227	1,181 \pm 0,217
	18	2,404 \pm 0,640	2,662 \pm 2,037	1,701 \pm 0,320	2,018 \pm 0,577

Tab. 7.8: COX-Aktivitäten [$\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$] im weißen Muskel von Kabeljau bei verschiedenen Meßtemperaturen für die einzelnen Populationen und Akklimationstemperaturen. (MW \pm SD, n = 6-8)

Population	Meßtempera- tur (°C)	Akklimationstemperatur (°C)			
		4	8	12	15
Nord-Ost- Arktischer Kabeljau (NEAC)	2		0,177 \pm 0,029	0,172 \pm 0,019	0,156 \pm 0,027
	5		0,224 \pm 0,062	0,227 \pm 0,049	0,200 \pm 0,046
	8		0,328 \pm 0,101	0,374 \pm 0,092	0,239 \pm 0,076
	12		0,474 \pm 0,123	0,443 \pm 0,060	0,359 \pm 0,033
	15		0,585 \pm 0,147	0,692 \pm 0,106	0,430 \pm 0,080
	18		0,739 \pm 0,155	0,640 \pm 0,141	0,555 \pm 0,052
Norwegischer Küsten- kabeljau (NCC)	2	0,174 \pm 0,023	0,147 \pm 0,012	0,151 \pm 0,025	0,160 \pm 0,020
	5	0,276 \pm 0,054	0,206 \pm 0,054	0,194 \pm 0,037	0,186 \pm 0,019
	8	0,390 \pm 0,099	0,286 \pm 0,110	0,207 \pm 0,062	0,262 \pm 0,061
	12	0,466 \pm 0,054	0,355 \pm 0,109	0,394 \pm 0,061	0,387 \pm 0,074
	15	0,593 \pm 0,135	0,441 \pm 0,063	0,475 \pm 0,071	0,475 \pm 0,038
	18	0,699 \pm 0,142	0,599 \pm 0,053	0,550 \pm 0,113	0,534 \pm 0,052
Nordsee- kabeljau (NC)	2	0,166 \pm 0,042	0,161 \pm 0,023	0,172 \pm 0,025	0,127 \pm 0,032
	5	0,210 \pm 0,045	0,239 \pm 0,037	0,157 \pm 0,013	0,158 \pm 0,028
	8	0,304 \pm 0,069	0,324 \pm 0,099	0,221 \pm 0,042	0,186 \pm 0,036
	12	0,482 \pm 0,105	0,438 \pm 0,100	0,325 \pm 0,044	0,261 \pm 0,067
	15	0,623 \pm 0,160	0,543 \pm 0,089	0,443 \pm 0,088	0,346 \pm 0,062
	18	0,701 \pm 0,191	0,679 \pm 0,047	0,476 \pm 0,050	0,413 \pm 0,047

Tab. 7.9: ETS-Aktivitäten in der Leber für die einzelnen Populationen und Akklimationstemperaturen, bezogen auf Frischgewicht und Gesamtleber. (MW \pm SD, n = 4-8, Meßtemperatur 12°C)

Population	Hälterungs- temperatur (°C)	ETS-Aktivität $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$	ETS-Aktivität x HSI $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ Leber}^{-1}$
Nord-Ost- Arktischer Kabeljau (NEAC)	4		
	8	$1,300 \pm 0,393$	$7,89 \pm 3,21$
	12	$1,370 \pm 0,387$	$7,93 \pm 1,98$
	15	$1,954 \pm 0,710$	$6,90 \pm 2,73$
Norwegischer Küsten- kabeljau (NCC)	4	$0,858 \pm 0,165$	$7,14 \pm 1,11$
	8	$1,068 \pm 0,183$	$8,95 \pm 1,00$
	12	$1,235 \pm 0,271$	$7,74 \pm 3,20$
	15	$1,612 \pm 0,383$	$8,17 \pm 2,75$
Nordsee- kabeljau (NC)	4	$1,164 \pm 0,281$	$10,05 \pm 2,35$
	8	$1,375 \pm 0,201$	$14,60 \pm 3,60$
	12	$0,711 \pm 0,169$	$7,67 \pm 2,17$
	15	$0,668 \pm 0,137$	$6,99 \pm 1,27$

Tab. 7.10: COX-Aktivitäten in der Leber für die einzelnen Populationen und Akklimationstemperaturen, bezogen auf Frischgewicht und Gesamtleber. (MW \pm SD, n = 4-8, Meßtemperatur 12°C)

Population	Hälterungs- temperatur (°C)	ETS-Aktivität $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$	ETS-Aktivität x HSI $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ Leber}^{-1}$
Nord-Ost- Arktischer Kabeljau (NEAC)	4		
	8	$0,367 \pm 0,067$	$2,38 \pm 1,14$
	12	$0,472 \pm 0,149$	$2,46 \pm 0,65$
	15	$0,720 \pm 0,233$	$2,37 \pm 0,54$
Norwegischer Küsten- kabeljau (NCC)	4	$0,311 \pm 0,070$	$2,57 \pm 0,36$
	8	$0,490 \pm 0,035$	$3,94 \pm 0,97$
	12	$0,493 \pm 0,110$	$3,41 \pm 1,14$
	15	$0,722 \pm 0,198$	$3,57 \pm 1,07$
Nordsee- kabeljau (NC)	4	$0,356 \pm 0,058$	$3,08 \pm 0,53$
	8	$0,334 \pm 0,058$	$3,48 \pm 0,62$
	12	$0,309 \pm 0,029$	$3,10 \pm 0,45$
	15	$0,288 \pm 0,047$	$2,85 \pm 0,49$

Tab. 7.11: In-transformierte ETS-Aktivitäten im weißen Muskel von Kabeljau bei verschiedenen Meßtemperaturen für die einzelnen Populationen und Akklimationstemperaturen. (MW \pm SD, n = 6-8)

Population	Meßtempera- tur (K ⁻¹)	Akklimationstemperatur (°C)			
		4	8	12	15
Nord-Ost- Arktischer Kabeljau (NEAC)	3,63		-1,377 \pm 0,174	-1,174 \pm 0,049	-1,660 \pm 0,293
	3,60		-1,202 \pm 0,308	-1,027 \pm 0,182	-1,387 \pm 0,193
	3,56		-0,922 \pm 0,257	-0,751 \pm 0,104	-1,134 \pm 0,182
	3,51		-0,371 \pm 0,338	-0,082 \pm 0,170	-0,669 \pm 0,242
	3,47		0,302 \pm 0,321	0,229 \pm 0,173	-0,022 \pm 0,231
	3,43		0,228 \pm 0,165	0,565 \pm 0,216	0,250 \pm 0,212
Norwe- gischer Küsten- kabeljau (NCC)	3,63	-1,140 \pm 0,279	-1,148 \pm 0,204	-1,048 \pm 0,337	-1,505 \pm 0,177
	3,60	-1,016 \pm 0,302	-0,871 \pm 0,194	-1,026 \pm 0,310	-1,315 \pm 0,268
	3,56	-0,761 \pm 0,294	-1,036 \pm 0,304	-0,850 \pm 0,290	-0,964 \pm 0,226
	3,51	-0,189 \pm 0,284	-0,025 \pm 0,197	-0,490 \pm 0,240	-0,468 \pm 0,245
	3,47	0,355 \pm 0,106	0,406 \pm 0,203	0,377 \pm 0,360	0,262 \pm 0,212
	3,43	0,767 \pm 0,179	0,905 \pm 0,227	0,730 \pm 0,228	0,640 \pm 0,255
Nordsee- kabeljau (NC)	3,63	-1,174 \pm 0,199	-1,132 \pm 0,314	-1,220 \pm 0,299	-1,188 \pm 0,197
	3,60	-1,061 \pm 0,094	-0,972 \pm 0,722	-1,012 \pm 0,419	-1,096 \pm 0,217
	3,56	-0,540 \pm 0,096	-0,722 \pm 0,351	-0,892 \pm 0,248	-1,039 \pm 0,140
	3,51	-0,092 \pm 0,116	-0,166 \pm 0,362	-0,469 \pm 0,223	-0,645 \pm 0,322
	3,47	0,503 \pm 0,242	0,350 \pm 0,427	0,080 \pm 0,206	0,152 \pm 0,180
	3,43	0,848 \pm 0,261	0,808 \pm 0,573	0,517 \pm 0,187	0,668 \pm 0,279

Tab. 7.12: In-transformierte COX-Aktivitäten im weißen Muskel von Kabeljau bei verschiedenen Meßtemperaturen für die einzelnen Populationen und Akklimationstemperaturen. (MW \pm SD, n = 6-8)

Population	Meßtempera- tur (K ⁻¹)	Akklimationstemperatur (°C)			
		4	8	12	15
Nord-Ost- Arktischer Kabeljau (NEAC)	3,63		-1,746 \pm 0,175	-1,763 \pm 0,111	-1,874 \pm 0,178
	3,60		-1,537 \pm 0,318	-1,506 \pm 0,229	-1,632 \pm 0,227
	3,56		-1,157 \pm 0,316	-1,011 \pm 0,255	-1,467 \pm 0,270
	3,51		-0,776 \pm 0,266	-0,822 \pm 0,133	-1,029 \pm 0,091
	3,47		-0,566 \pm 0,266	-0,379 \pm 0,154	-0,860 \pm 0,193
	3,43		-0,322 \pm 0,212	-0,469 \pm 0,237	-0,592 \pm 0,093
Norwe- gischer Küsten- kabeljau (NCC)	3,63	-1,755 \pm 0,134	-1,923 \pm 0,086	-1,902 \pm 0,160	-1,838 \pm 0,125
	3,60	-1,305 \pm 0,199	-1,611 \pm 0,280	-1,655 \pm 0,191	-1,687 \pm 0,100
	3,56	-0,970 \pm 0,257	-1,318 \pm 0,390	-1,613 \pm 0,306	-1,364 \pm 0,243
	3,51	-0,768 \pm 0,114	-1,073 \pm 0,294	-0,943 \pm 0,157	-0,966 \pm 0,187
	3,47	-0,546 \pm 0,232	-0,827 \pm 0,142	-0,756 \pm 0,160	-0,747 \pm 0,082
	3,43	-0,378 \pm 0,209	-0,516 \pm 0,088	-0,616 \pm 0,205	-0,631 \pm 0,098
Nordsee- kabeljau (NC)	3,63	-1,826 \pm 0,271	-1,834 \pm 0,148	-1,769 \pm 0,150	-2,091 \pm 0,274
	3,60	-1,582 \pm 0,232	-1,444 \pm 0,155	-1,857 \pm 0,084	-1,857 \pm 0,183
	3,56	-1,213 \pm 0,236	-1,174 \pm 0,346	-1,526 \pm 0,195	-1,698 \pm 0,186
	3,51	-0,750 \pm 0,216	-0,847 \pm 0,223	-1,131 \pm 0,133	-1,374 \pm 0,264
	3,47	-0,504 \pm 0,271	-0,623 \pm 0,161	-0,831 \pm 0,214	-1,076 \pm 0,189
	3,43	-0,387 \pm 0,267	-0,389 \pm 0,067	-0,747 \pm 0,107	-0,890 \pm 0,125

Tab. 7.13: Arrhenius-Break-Temperaturen und Aktivierungsenergien in den verschiedenen Meßtemperaturbereichen für das ETS im weißen Muskel von Kabeljau für die einzelnen Populationen und der Akklimationstemperaturen. (MW \pm SD, n = 5-8)

Popu- lation	Hälterungs- temperatur (°C)	ABT (°C)	Tempera- turbereich (y - z) (°C)	E _a (kJ mol ⁻¹) (y - z)	Tempera- turbereich (x - y) (°C)	E _a (kJ mol ⁻¹) (x - y)
NEAC	4					
	8		2-18	75,83 \pm 7,47		
	12		2-18	78,46 \pm 4,56		
	15		2-18	86,10 \pm 8,13		
NCC	4	8 \pm 2	2-8	34,79 \pm 17,26	12-18	110,03 \pm 25,88
	8	6 \pm 2	2-8	16,57 \pm 21,69	12-18	102,95 \pm 18,18
	12	10 \pm 2	2-12	41,85 \pm 8,66	15-18	93,97 \pm 39,49
	15		2-18	93,60 \pm 9,45		
NC	4	8 \pm 3	2-8	60,77 \pm 19,22	12-18	99,83 \pm 20,54
	8	9 \pm 3	2-8	43,95 \pm 18,67	12-18	112,03 \pm 45,92
	12	10 \pm 2	2-12	41,67 \pm 9,37	15-18	94,29 \pm 11,92
	15	11 \pm 2	2-12	35,22 \pm 16,41	15-18	119,99 \pm 54,03

Tab. 7.14: Q₁₀-Werte in verschiedenen Temperaturbereichen für das ETS im weißen Muskel von Kabeljau für die einzelnen Populationen und der Akklimationstemperaturen. (MW \pm SD, n = 5-8)

Population	Hälterungs- temperatur (°C)	Q ₁₀ (2 - 8°C)	Q ₁₀ (12 - 18°C)
Nord-Ost-Arktischer Kabeljau (NEAC)	4		
	8	2,23 \pm 0,72	3,51 \pm 1,74
	12	2,12 \pm 0,22	3,46 \pm 1,15
	15	2,29 \pm 1,11	3,90 \pm 1,10
Norwegischer Küstenkabeljau (NCC)	4	1,78 \pm 0,53	5,23 \pm 1,91
	8	1,36 \pm 0,47	4,23 \pm 0,84
	12	1,34 \pm 0,36	7,14 \pm 0,78
	15	2,34 \pm 0,77	6,57 \pm 1,82
Nordseekabeljau (NC)	4	2,68 \pm 0,79	4,39 \pm 1,25
	8	2,05 \pm 0,58	4,89 \pm 3,05
	12	1,91 \pm 0,84	5,30 \pm 1,29
	15	1,33 \pm 0,27	9,95 \pm 4,48

Tab. 7.15: Arrhenius-Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte für die COX im weißen Muskel von Kabeljau für die einzelnen Populationen und der Akklimationstemperaturen. (MW \pm SD, n = 5-8)

Population	Hälterungs- temperatur (°C)	E_a (kJ mol ⁻¹) (12 - 18°C)	Q_{10} (2 - 18°C)
Nord-Ost-Arktischer Kabeljau (NEAC)	4		
	8	60,97 \pm 4,63	2,50 \pm 0,17
	12	55,43 \pm 8,18	2,31 \pm 0,28
	15	52,96 \pm 4,19	2,22 \pm 0,14
Norwegischer Küstenkabeljau (NCC)	4	57,87 \pm 7,83	2,20 \pm 0,29
	8	54,05 \pm 9,23	2,27 \pm 0,31
	12	55,24 \pm 4,12	2,30 \pm 0,15
	15	56,51 \pm 4,04	2,34 \pm 0,14
Nordseekabeljau (NC)	4	59,68 \pm 8,06	2,36 \pm 0,23
	8	60,20 \pm 3,47	2,47 \pm 0,13
	12	50,44 \pm 7,26	2,15 \pm 0,24
	15	51,72 \pm 5,33	2,18 \pm 0,18

Danksagung

Ich danke:

Herrn Professor Dr. Hans-Otto Pörtner für die Vergabe der Diplomarbeit und die gute Betreuung

Herrn Professor Dr. Gunter-Otto Kirst für die Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit

Den Mitgliedern (ganz oder teilweise) der Arbeitsgruppe Ökophysiologie, im besonderen:

Torsten Fischer für die vielen persönlichen Mitteilungen

Olaf Heilmayer für die Versorgung mit Lesestoff

Timo Hirse für die Hilfe bei technischen Problemen

Angela Sommer für die wissenschaftliche Betreuung und Beratung in statistischen Fragen

Meinen Eltern und Loreen für finanzielle und/oder „seelische“ Unterstützung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

„Temperaturanpassung mitochondrialer Enzyme des Kabeljaus (*Gadus morhua*) im latitudinalen Gradienten“, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Bremerhaven, den 05. 04. 2001